

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu



Potencjalna aktywność DNazowa oraz możliwe funkcje biologiczne wybranych wariantów delecyjnych ludzkiej rybonukleazy Dicer

A putative DNase activity and possible biological functions
of the selected truncated variants of human ribonuclease Dicer

mgr inż. Marta Katarzyna Wojnicka

Praca doktorska wykonana

w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein

pod kierunkiem dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, prof. IChB PAN

Poznań 2023

Podziękowania

*Szczególne podziękowania składam mojej Pani Promotor,
dr hab. Annie Kurzyńskiej-Kokorniak, prof. IChB PAN
za merytoryczne ukierunkowanie niniejszej rozprawy doktorskiej,
cenne rady oraz dyskusje, które w sposób znaczący przyczyniły się do jej powstania.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein IChB PAN
za owocną współpracę, a w szczególności dr Kindze Ciechanowskiej i dr inż. Agnieszce
Szczepańskiej za nieustające wsparcie, wspólną walkę na tym samym Dicer-froncie oraz
twórcze dyskusje o charakterze nie tylko naukowym.*

*Dziękuję dr. Arkadiuszowi Kajdaszowi z Pracowni Bioinformatyki IChB PAN za pomoc
w analizie wyników sekwencjonowania NGS.*

*Za wszelką pomoc i niezapomnianą atmosferę dziękuję również wszystkim Koleżankom
i Kolegom z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej,
Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin, Zakładu Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin
oraz Zakładu Neurobiologii Molekularnej.*

Dorobek naukowy doktorantki:

1. Kazimierczyk M., **Wojnicka M.**, Biała E., Żydowicz-Machtel P., Imiołczyk B., Ostrowski T., Kurzynska-Kokorniak A., Wrzesinski J. (2022). Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7):3644. IF₂₀₂₁ 6,208.
2. Szczepanska A., **Wojnicka M.**, Kurzynska-Kokorniak A. (2021). The Significance of the DUF283 Domain for the Activity of Human Ribonuclease Dicer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13;22(16):8690. IF₂₀₂₁ 6,208.
3. Koralewska N.*, Szczepanska A.*, Ciechanowska K., **Wojnicka M.**, Pokornowska M., Milewski C.M., Gudanis D., Baranowski D., Nithin C., Bujnicki M.J., Gdaniec Z., Figlerowicz M. & Kurzynska-Kokorniak A. (2021). RNA and DNA G-quadruplexes bind to human dicer and inhibit its activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78:3709–3724. IF₂₀₂₁ 9,207.
4. **Wojnicka M.**, Szczepanska A., Kurzynska-Kokorniak A. (2020). Unknown Areas of Activity of Human Ribonuclease Dicer: A Putative Deoxyribonuclease Activity. *Molecules*, 25(6), 1414. IF₂₀₂₁ 4,927.
5. Pokornowska M., Milewski C.M., Ciechanowska K., Szczepanska A., **Wojnicka M.**, Radogostowicz Z., Figlerowicz M. & Kurzynska-Kokorniak A. (2020). The RNA-RNA base pairing potential of human Dicer and Ago2 proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78:3709–3724. IF₂₀₂₁ 9,207.

Spis treści

Dorobek naukowy doktorantki:	3
Wykaz stosowanych skrótów:	7
Streszczenie	9
Summary	11
1. Wstęp	13
1.1 Struktura i biogeneza krótkich regulatorowych RNA — miRNA oraz siRNA	13
1.2 Rola srRNA w potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genów	16
1.3 Budowa i model działania ludzkiej rybonukleazy Dicer	18
1.4 Udział domen rybonukleazy hDicer w wiązaniu substratu pre-miRNA	20
1.5 Funkcje Dicer niepowiązane ze szklakiem biogenezy krótkich regulatorowych RNA	22
1.6 Aktywność DNazowa rybonukleazy Dicer	26
2. Cel pracy	30
3. Materiały	31
3.1 Linie komórkowe	31
3.2 Szczepy bakteryjne	31
3.3 Pożywki	31
3.4 Wektory i konstrukcje genowe	32
3.5 Startery	33
3.6 Oligonukleotydy	36
3.7 Enzymy oraz bufony reakcyjne	37
3.8 Przeciwciała	37
3.9 Zestawy reakcyjne	38
3.10 Standardy wielkości	39
3.11 Bufory i roztwory	39
3.12 Żele poliakrylamidowe	41
3.13 Najważniejsze odczynniki i materiały:	43
4. Metody	44
4.1 Praca z kwasami nukleinowymi	44
4.1.1 Przygotowanie konstrukcji genowych z sekwencją kodującą hDicer pełnej długości oraz wariant pozbawiony domeny PAZ w systemie SureVector	44
4.1.2 Przygotowanie konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e	48
4.1.3 Przygotowanie konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e z mutacją w domenach RNazy III	51

4.1.4	Selekcja stransformowanych kolonii bakteryjnych	54
4.1.5	Izolacja plazmidowego DNA.....	55
4.1.6	Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych, w warunkach denaturujących	55
4.1.7	Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych, w warunkach natywnych	56
4.1.8	Znakowanie izotopem ³² P końca 5' oligonukleotydów RNA i DNA	56
4.1.9	Oczyszczanie kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych.....	57
4.1.10	Przygotowanie dwuniciowych cząsteczek RNA	57
4.1.11	Cięcie cząsteczek RNA i DNA przez hDicer	57
4.1.12	Badanie oddziaływań białko-RNA metodą różnicowej migracji w żelach poliakrylamidowych (EMSA)	58
4.1.13	Izolacja całkowitego RNA z ludzkich linii komórkowych.....	58
4.1.14	Izolacja mRNA z ludzkich linii komórkowych	59
4.1.15	Odwrotna transkrypcja dla cząsteczek miRNA	59
4.1.16	Odwrotna transkrypcja dla cząsteczek mRNA	60
4.1.17	Analiza poziomu miRNA oraz ekspresji genu <i>DICER1</i> metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)	60
4.2	Praca z komórkami ssaczymi	61
4.2.1	Hodowla komórek ssaczycy	61
4.2.2	Pasażowanie komórek.....	61
4.2.3	Transfekcja komórek i przygotowanie osadów komórkowych	62
4.2.4	Przygotowanie lizatów komórkowych.....	62
4.2.5	Izolacja frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej z komórek HEK293T.....	63
4.2.6	Indukcja procesu apoptozy w komórkach	63
4.3	Praca z białkami	64
4.3.1	Immunoprecypitacja białek.....	64
4.3.2	Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	65
4.3.3	Półsuchy elektrotransfer białek na membranę PVDF.....	65
4.3.4	Detekcja białek immobilizowanych na membranie PVDF.....	65
4.4	Sekwencjonowanie RNA	66
5.	Wyniki	68
5.1	Badanie potencjalnej aktywności DNazowej hDicer.....	68
5.1.1	Aktywność nukleazowa wariantów ΔPAZ i ΔPPC	71
5.1.2	Aktywność DNazowa wariantów ΔHelikaza, ΔHelikaza-DUF283, ΔDUF(630-709aa) oraz ΔDUF(625-752aa) hDicer	83

5.2	Skrócone formy hDicer: charakterystyka wariantu Dicer1e.....	92
5.2.1	Analiza obecności wariantu Dicer1e w komórkach HEK293T i HEK293T No_Dice.....	97
5.2.2	Badanie aktywności RNazowej wariantu Dicer1e w warunkach <i>in vitro</i>	103
5.2.3	Analiza poziomu wybranych krótkich RNA w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice produkujących wariant Dicer1e.....	110
5.2.4	Badanie aktywności DNazowej wariantu Dicer1e w warunkach <i>in vitro</i>	112
5.2.5	Porównanie profilu ekspresji genów w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice produkujących wariant Dicer1e	116
6.	Dyskusja	129
7.	Wnioski.....	141
8.	Załącznik	142
9.	Literatura	143

Wykaz stosowanych skrótów:

3x Flag Taq — znacznik Flag Tag

5LO — 5'-lipooksygenaza

aa — aminokwas

cDNA — komplementarny DNA
(ang. *Complementary DNA*)

C-koniec — koniec karboksylowy białka

dNTP — trifosforany deoksyrybonukleotydów

dsDNA — dwuniciowy DNA
(ang. *double-stranded DNA*)

dsRBD — domena wiążąca dsRNA
(ang. *double-stranded RNA binding domain*)

dsRNA — dwuniciowy RNA
(ang. *double-stranded RNA*)

DUF283 — domena o nieznannej funkcji 283
(ang. *domain of unknown function 283*)

EMSA — metoda różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym
(ang. *electrophoretic mobility shift assay*)

GO — ontologia genów (ang. *gene ontology*)

hDicer — ludzka rybonukleaza Dicer
(ang. *human Dicer*)

HEK 293T — linia komórkowa ludzkich komórek embrionalnych nerki 293
(ang. *Human Embryonic Kidney 293 Cell line*)

hg38 — ludzki genom wersja 38

kDa — kilo Dalton

miRNA — mikro RNA

mRNA — matrycowy RNA

NGS — sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*)

N-koniec — koniec aminowy białka

nt — nukleotyd

OE-PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy z wydłużaniem nakładających się fragmentów matryc (ang. *Overlap Extension PCR*)

PAA — poliakrylamid

PAZ — domena Piwi/Argonaute/Zwill
(ang. *Piwi/Argonaute/Zwill*)

PPC — domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej (ang. *PPC cassette*)

PCR — reakcja łańcuchowej polimerazy
(ang. *polymerase chain reaction*)

pDNA — plazmidowy DNA

pre-miRNA — prekursor miRNA
(ang. *precursor miRNA*)

pre-siRNA — prekursor siRNA
(ang. *siRNA precursor*)

pri-miRNA — pierwotny transkrypt miRNA
(ang. *primary miRNA*)

pz — par zasad

RNAi — interferencja RNA (ang. *RNA interference*)

Wykaz stosowanych skrótów:

RNA-seq — sekwencjonowanie RNA
(ang. *RNA sequencing*)

rpm — obroty na minutę
(ang. *rotations per minute*)

qPCR — reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative PCR*)

SDS — siarczan dodecyłu sodu
(ang. *sodium dodecyl sulfate*)

siRNA — krótki interferujący RNA
(ang. *small interfering RNA*)

srRNA — krótki regulatorowy RNA
(ang. *small regulatory RNA*)

ssDNA — jednoniciowy DNA
(ang. *single-stranded DNA*)

ssRNA — jednoniciowy RNA
(ang. *single-stranded RNA*)

UTR — region niepodlegający translacji
(ang. *untranslated region*)

wt hDicer — hDicer pełnej długości

Streszczenie

Kluczową rolę w biogenezie krótkich regulatorowych RNA (srRNA) odgrywa rybonukleaza Dicer, która wycina duplekisy mikroRNA (miRNA) oraz małe interferujące RNA (siRNA), z odpowiednio: jednoniciowych prekursorów miRNA przyjmujących strukturę spinki (pre-miRNA) oraz z długich dwuniciowych RNA (dsRNA), tzw. pre-siRNA. Generowane przez Dicer srRNA biorą udział w procesie regulacji ekspresji genów. Przedstawiona rozprawa doktorska skupia się na ludzkiej rybonukleazie Dicer (hDicer). hDicer jest białkiem wielodomenowym, zbudowanym z następujących po sobie domen: N-końcowej domeny helikazowej, domeny DUF283, domeny Platformy, PAZ oraz helisy łączącej, dwóch domen RNazy III (RNaza IIIa i IIIb) oraz C-końcowej domeny wiążącej dwuniciowy RNA (dsRBD). Istotną rolę w wiązaniu substratów pre-miRNA oraz pre-siRNA odgrywają domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej (tzw. kasetę PPC). Odległość pomiędzy kasetą PPC a domenami RNazowymi determinuje długość generowanych produktów; w przypadku hDicer długość generowanych srRNA wynosi ~22 nukleotydy (nt).

Obecność wszystkich domen hDicer jest kluczowa dla wydajnego i precyzyjnego cięcia substratów pre-miRNA, a tym samym, generowania miRNA o określonej długości. Dane literaturowe wskazują, że białka oddziałujące z Dicer, przypuszczalnie poprzez wpływ na aranżację jej domen, mogą wpływać na długość produktów generowanych przez tę rybonukleazę. Co ciekawe, znane są warianty rybonukleaz Dicer pozbawione niektórych z domen, tzw. „skrócone formy” („skrócone warianty”) Dicer. Skrócone formy Dicer mogą powstawać, między innymi, w rezultacie procesu alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu kodującego Dicer, bądź w wyniku aktywności hydrolitycznej proteaz komórkowych. Aktywności skróconych form Dicer różnią się od aktywności białek „pełnej długości”. Przykładowo, wariant Dicer pozbawiony domeny helikazowej preferencyjnie wiąże substraty pre-siRNA. Wykazano także, iż u nicienia *Caenorhabditis elegans* aktywowane podczas procesu apoptozy kaspazy przecinają Dicer, generując skróconą formę białka (tDCR-1), która pełni funkcję deoksyrybonukleazy (DNazy) inicjującej proces fragmentacji chromosomalnego DNA.

Pierwszym celem przedłożonej rozprawy doktorskiej było zbadanie, czy hDicer, podobnie jak Dicer *C. elegans*, posiada potencjał do hydrolizy substratów DNA. W wybranych do badań komórkach ludzkich, w których wywoływany był proces apoptozy, nie udało się zidentyfikować skróconej formy hDicer podobnej do tDCR-1 *C. elegans*. W celu odpowiedzi

na pytanie, czy hDicer, podobnie jak Dicer pochodząca z *C. elegans*, może prezentować aktywność DNazową, z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej otrzymano szereg skróconych form hDicer, w tym wariant odwzorowujący tDCR-1 *C. elegans*. Wariant hDicer odwzorowujący skróconą formę Dicer *C. elegans* nie wykazywał aktywności DNazowej. Zgromadzone dane ujawniły jednak, że warianty hDicer pozbawione domeny DUF283 oraz warianty nieposiadające domeny PAZ lub całej kasety PPC prezentują aktywność DNazową. Uzyskane wyniki wykazały, iż hDicer posiada potencjał do hydrolizy zarówno jedno-, jak i dwuniciowych DNA.

Drugi nurt badawczy poświęcony był analizie wariantów hDicer powstających w komórkach i próbie zdefiniowania ich funkcji. Analizy transkryptomyczne pozwoliły na zidentyfikowanie szeregu skróconych wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1*. Wśród nich zidentyfikowano wariant opisany w literaturze jako *Dicer1e*. Wariant ten powstaje w wyniku procesu alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *DICER1*. Białko *Dicer1e*, w odróżnieniu od hDicer, posiada unikatowy koniec N oraz zaledwie trzy domeny: RNazy IIIa, RNazy IIIb oraz dsRBD. *Dicer1e* ulega ekspresji zarówno w komórkach zdrowych (prawidłowych), jak i zmienionych nowotworowo. Wiadomo, że poziom ekspresji *Dicer1e* jest tkankowo-specyficzny, a w przypadku komórek nowotworowych, zależy także od typu i przypuszczalnie stopnia rozwoju nowotworu. Jak dotąd, nie scharakteryzowano aktywności biochemicznych białka *Dicer1e*. Z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej otrzymano preparat białkowy *Dicer1e*, a następnie zbadano aktywności biochemiczne prezentowane przez ten wariant. Testy aktywności nukleazowej wykazały, że *Dicer1e* nie generuje produktów miRNA, jednakże może on hydrolizować krótkie RNA. Co ciekawe, *Dicer1e* wykazywał aktywność DNazową. W celu zbadania potencjalnej komórkowej funkcji wariantu *Dicer1e*, wykorzystano komórki HEK293T oraz HEK293T No Dice (linia typu *DICER1 knock out*, w której nie powstaje endogenna hDicer), które były transfekowane plazmidem umożliwiającym produkuję wariantu *Dicer1e*. Następnie przeprowadzono analizy NGS puli całkowitego RNA izolowanego ze wspomnianych linii komórkowych. Badano także poziom ekspresji wybranych miRNA w użytych w badaniach liniach komórkowych. Zgromadzone dane sugerują, że wariant *Dicer1e* może być zaangażowany w metabolizm komórkowych RNA i, co ciekawe, organizację struktury chromatyny.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat udziału białek typu Dicer w procesach komórkowych wykraczających poza ścieżki biogenezy srRNA.

Summary

A key role in the biogenesis of small regulatory RNAs (srRNAs) is played by the Dicer ribonuclease, which cuts out microRNA (miRNA) and small interfering RNA (siRNA) duplexes from single-stranded hairpin precursors (pre-miRNAs) or long double-stranded RNAs (dsRNAs), i.e., pre-siRNAs, respectively. Dicer-generated srRNAs are involved in the regulation of gene expression. The presented studies focus on human ribonuclease Dicer (hDicer). hDicer is a multi-domain protein composed of an N-terminal helicase domain, a DUF283 domain, Platform, PAZ, and a connector helix, two RNase III domains (RNase IIIa and IIIb) and a C-terminal dsRNA binding domain (dsRBD). Platform, PAZ and connector helix domains (the so-called PPC cassette) play an important role in the binding of pre-miRNA and pre-siRNA substrates. The distance between the PPC cassette and the RNase domains determines the length of the generated products; in the case of hDicer, the length of the produced srRNAs is about 22 nucleotides (nt)

The presence of all hDicer domains is crucial for the efficient and precise cleavage of pre-miRNA substrates, and thus, generating miRNAs of a specific length. Literature data indicate that proteins interacting with Dicer, presumably by affecting the arrangement of its domains, can influence the length of RNAs produced by this ribonuclease. Interestingly, Dicer variants lacking some of the domains, so-called "shortened forms" ("truncated variants") of Dicer, have been identified. Truncated variants of Dicer can arise from alternatively spliced transcripts of the *DICER1* gene, or as a result of a hydrolytic activity of cellular proteases. The biological functions and enzymatic activities of truncated variants of Dicer differ from the functions and activities displayed by the "full-length" proteins. For example, a Dicer variant lacking the helicase domain preferentially binds pre-siRNA substrates. It has also been shown that in nematode *Caenorhabditis elegans*, a truncated form of Dicer (tDCR-1) is produced by the caspases during apoptosis, and this truncated form initiates the chromosomal DNA fragmentation.

The first goal of the PhD studies was to investigate whether hDicer, similarly as *C. elegans* Dicer, has the potential to hydrolyze DNA substrates. In the apoptosis-induced human cell lines, a truncated form of hDicer similar to *C. elegans* tDCR-1 was not identified. Nevertheless, to answer the question whether hDicer, like *C. elegans* Dicer, can display a DNase activity, a number of truncated hDicer variants were prepared using genetic engineering methods, including a variant corresponding to the tDCR-1 form of *C. elegans*. The hDicer variant

corresponding to *C. elegans* tDCR-1 did not exhibit DNase activity. However, the collected data revealed that the hDicer variants lacking the DUF283 domain or the PAZ domain, or the entire PPC cassette, could hydrolyze both single-stranded and double-stranded DNA.

The second part of the research has focused on the analysis of natural hDicer variants and their putative functions. Transcriptomic analyses revealed several truncated transcript variants of the *DICER1* gene. Among them, a variant designated as Dicer1e was identified. This variant is generated by an alternative splicing of the primary transcript of the *DICER1* gene. In comparison to hDicer, the Dicer1e protein has a unique N-terminus and only three domains: RNase IIIa, RNase IIIb and dsRBD. Dicer1e is expressed in healthy (normal) and tumor cells. It is known that the level of Dicer1e expression is tissue-specific and, in the case of cancer cells, it also depends on the type and tumor stage. So far, the biochemical properties of the Dicer1e protein have not been characterized. Consequently, using genetic engineering methods, a protein preparation of Dicer1e was obtained, and its biochemical activities were investigated. The RNase activity assays showed that Dicer1e does not produce miRNAs; however, it can hydrolyze small RNAs. Interestingly, Dicer1e exhibited also the DNase activity.

To investigate the potential biological roles of the Dicer1e variant, HEK293T and HEK293T No Dice cells (a *DICER1* knock out cell line that does not produce the endogenous hDicer) were used. These cells were transfected with a plasmid producing the Dicer1e variant. Next, the RNA-Seq of the total RNA fractions isolated from the used cell lines were performed. The expression levels of selected miRNAs in the cell lines used in the study were also examined. The collected data suggest that the Dicer1e variant may be involved in cellular RNA metabolism and, interestingly, the organization of chromatin structure.

The results obtained in the course of the conducted studies expand our knowledge on the potential role of Dicer-type proteins in cellular processes extending well beyond the srRNA biogenesis pathways.

1. Wstęp

W ciągu ostatnich lat, wraz z rozwojem badań genomowych i transkryptomicznych można zaobserwować znaczący wzrost zainteresowania frakcją RNA niekodującą białek — tzw. niekodującymi RNA (ncRNA, ang. *noncoding RNA*). Obecnie uważa się, iż w komórkach eukariotycznych cząsteczki ncRNA stanowią ponad 90% puli całkowitego RNA [1, 2]. Ze względu na pełnione funkcje ncRNA można podzielić na dwie grupy: konstytutywne i regulatorowe. Pierwszą grupę stanowią cząsteczki RNA, które są obecne w komórce na stałym poziomie i warunkują podstawowe procesy komórkowe takie jak biosynteza białka oraz dojrzewanie i modyfikacja pierwotnych transkryptów mRNA. Wśród nich wyróżnić można: rybosomalne RNA (rRNA), transportujące RNA (tRNA), krótkie jądrowe RNA (snRNA) oraz krótkie jąderkowe RNA (snoRNA). Do grupy regulatorowych RNA zaliczamy krótkie cząsteczki RNA (srRNA, ang. *short regulatory RNA*) odpowiedzialne za kontrolę ekspresji genów i właściwe funkcjonowanie organizmu. Cząsteczki te działają jak specyficzne sondy umożliwiające odpowiednim partnerom białkowym rozpoznanie komplementarnych transkryptów mRNA lub rejonów DNA, które mają podlegać regulacji. Wśród nich wyróżnić można między innymi: mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*), krótkie interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*), diRNA (ang. *DNA damage-induced small RNA*) [3] oraz RNA oddziałujące z białkami Piwi (ang. *PIWI-interacting RNA*) [4]. Poziom srRNA w komórce jest zmienny i zależy m.in. od etapu rozwoju organizmu, czynników środowiskowych, jak i od stanu patologicznego komórki (w tym, od nowotworzenia) [5, 6]. Co ciekawe, sekwencje kodujące srRNA mogą być zarówno zawarte w genomie, jak również mogą mieć pochodzenie egzogenne.

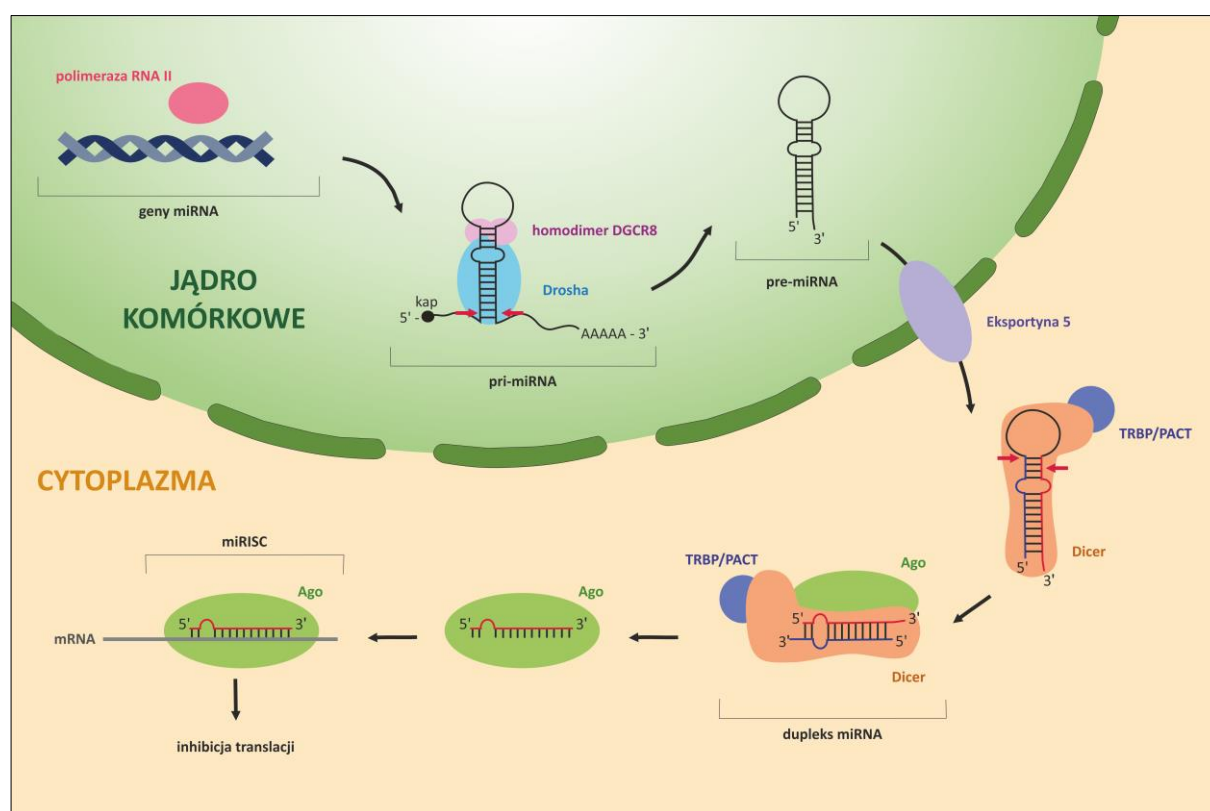
1.1 Struktura i biogeneza krótkich regulatorowych RNA — miRNA oraz siRNA

Najlepiej scharakteryzowanymi cząsteczkami srRNA są miRNA oraz siRNA biorące bezpośredni udział w zachowawczym ewolucyjnie procesie wyciszania ekspresji genów inicjowanym przez dwuniciowy RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*) — interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) [7-10]. Cechą charakterystyczną tych cząsteczek jest ich długość, ~20-30 nukleotydów (nt), oraz zdolność do interakcji z białkami Argonaute (Ago), z którymi współtworzą kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*).

miRNA to krótkie, jednoniciowe cząsteczki RNA. Stanowią one dominującą pulę srRNA u ssaków. Cząsteczki te biorą udział w kontroli kluczowych procesów biologicznych

takich jak m.in.: podziały komórkowe, kontrola wzrostu i różnicowania komórek [11], apoptoza, przebudowa chromatyny [12] i rearanżacja genomu [13] oraz odpowiedź na zakażenia wirusowe [14, 15]. Podejrzewa się, iż cząsteczki miRNA kontrolują ekspresję ponad 60% ludzkich genów [16]. Ze względu na udział w kontroli licznych procesów biologicznych niekontrolowane zmiany w poziomie dojrzałych miRNA w komórce mogą skutkować rozwojem stanów patologicznych, m.in.: nowotworów [17], chorób neurodegeneracyjnych [18] lub chorób układu krążenia [19].

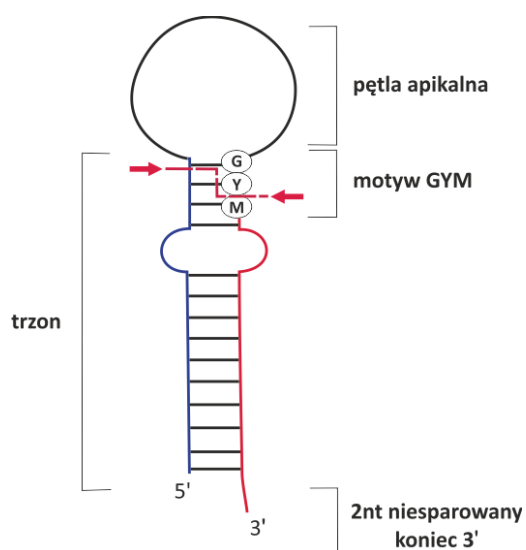
Biogeneza miRNA jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się w jądrze komórkowym, a kończącym się w cytoplazmie (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie biogenezy i funkcjonowania miRNA w komórce zwierzęcej. Czerwonymi strzałkami zaznaczono miejsce hydrolizy substratu RNA przez białko Drosha i Dicer.

Cząsteczki miRNA są kodowane przez geny miRNA znajdujące się pod kontrolą niezależnych promotorów transkrypcji lub są transkrybowane z sekwencji intronowych genów kodujących białka, jak również z obszarów międzygenowych [20, 21]. Ekspresja genów miRNA zachodzi w obrębie jądra komórkowego najczęściej przy udziale polimerazy RNA II

w wyniku czego powstaje pierwotny transkrypt zwany pri-miRNA (ang. *primary miRNA*) [20, 22]. Co ciekawe, pojawiające się doniesienia literaturowe wskazują również na pochodzenie miRNA z krótkich intronów tzw. miRtronów. Są to introny zawierające sekwencję prekursora miRNA, którego wycięcie zachodzi w wyniku składania transkryptu (ang. *splicing*) [23, 24]. Pierwotny transkrypt miRNA składa się z kilku tysięcy nukleotydów i może zawierać jedną bądź kilka struktur typu spinki do włosów oraz jednoniciowe rejony oskrzydłające (Rysunek 1). Struktura typu spinki do włosów złożona jest z dwuniciowego rejonu trzonu, oraz rozluźnionej części apikalnej tzw. rejonu pętli. W kolejnym etapie, pri-miRNA jest rozpoznawany przez obecny w jądrze komórkowym kompleks enzymatyczny (kompleks mikroprocesora) w skład którego wchodzi: rybonukleaza (RNazaIII) Drosha i białka wiążące RNA DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region gene*). Drosha wiąże pri-miRNA w obrębie rozgałęzienia struktury typu spinki do włosów do jednoniciowych struktur oskrzydłających i przecina obie nici duplesu [25]. Za stabilizację kompleksu mikroprocesora i aktywację cięcia pri-miRNA odpowiada homodimer DGCR8, który wiąże się pomiędzy pętlą apikalną a trzonem pri-miRNA [25, 26]. Produktem cięcia jest fragment o długości ~60-70 nt określany jako pre-miRNA. Częsteczki pre-miRNA przyjmują strukturę drugorzędową typu spinki do włosów złożoną z rejonu dwuniciowego (trzonu) oraz pętli apikalnej (Rysunek 2). Na końcu 5' posiadają resztę fosforanową, z którego generowany jest miRNA-5p. Cechą charakterystyczną cząsteczek pre-miRNA jest niesparowany koniec 3' z resztą hydroksylową, z którego generowany jest miRNA-3p (Rysunek 2) [27, 28].



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie struktury pre-miRNA. Na niebiesko zaznaczono ramię 5', na czerwono zaznaczono ramię 3'. Strzałkami zaznaczono miejsce cięcia przez Dicer.

Następnie, za pośrednictwem eksportyny 5 i białka Ran-GTP, pre-miRNA jest eksportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy. W cytoplazmie pre-miRNA jest wiązany przez rybonukleazę (RNazę III) Dicer działającą w kompleksie z Ago i partnerami białkowymi, np. TRBP (ang. *TAR RNA binding protein*). Rybonukleaza Dicer wiąże cząsteczkę pre-miRNA i wycina z niej dwuniciowy fragment o długości ~22 par zasad (pz) tworzący dupleks zawierający funkcjonalną cząsteczkę miRNA (Rysunek 1) [29]. Kluczowy wpływ na wybór miejsca cięcia pre-miRNA, jak i generowanie produktów o długości ~22 pz przez Dicer ma przestrzenne ułożenie enzymu względem substratu oraz obecność motywu GYM w sekwencji pre-miRNA. Motyw GYM obejmuje 3 nukleotydową sekwencję obecną pod pętlą apikalną w strukturze pre-miRNA, oznaczającą odpowiednio: G — sparowana guanina, Y — sparowana pyrimidyna, M — niesparowana cytozyna lub adenina (Rysunek 2) [30].

W przypadku cząsteczek siRNA, ze względu na źródło pochodzenia ich prekursora, możemy wyróżnić dwie grupy: egzo-siRNA oraz endo-siRNA. Cząsteczki egzo-siRNA powstają z długich dwuniciowych RNA wprowadzanych do wnętrza komórki jako materiał genetyczny wirusa w wyniku infekcji lub w formie syntetycznej na drodze eksperymentalnej bądź terapeutycznej. Cząsteczki endo-siRNA są charakterystyczne dla roślin, bezkręgowców i grzybów, jednakże ich obecność i funkcjonowanie zaobserwowano również w oocytach niektórych kręgowców [31-33] i embrionalnych komórkach macierzystych myszy [34-39]. Prekursory endo-siRNA stanowią dsRNA powstałe z komplementarnych sensownych i antysensownych transkryptów w układach *cis* i *trans* lub transkryptów przyjmujących strukturę spinki do włosów [40, 41]. Co więcej, prekursorem endo-siRNA mogą być także transkrypty pseudogenów hybrydujące do mRNA swoich funkcjonalnych odpowiedników [39, 42]. Obecne w cytoplazmie prekursory egzo- jak i endo-siRNA są cięte przez rybonukleazę Dicer niezależnie od kompleksu mikroprocesora. Efektem cięcia jest dwuniciowa cząsteczka RNA o długości ~21-22 pz, w której jedna z nici (siRNA) jest komplementarna do transkryptu genu docelowego.

1.2 Rola srRNA w potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genów

Istotnym etapem w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów jest utworzenie się kompleksu ładującego RLC (ang. *RISC-loading complex*), a następnie jego przekształcenie się w kompleks wyciszający RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). W skład kompleksu RLC wchodzi białko Dicer, TRBP oraz Ago. Kompleks ten odpowiada za przekazanie dupleksu generowanego przez Dicer do białka Ago [43-45]. Proces przekształcania się kompleksu

ładującego w wyciszający zapoczątkowany jest wyborem nici efektorowej (wiodącej) w duplesie srRNA. Wybór nici wiodącej (ang. *guide strand*) komplementarnej do sekwencji wyciszanych transkryptów jest związany ze stabilnością termodynamiczną końców duplesu srRNA. W duplesie nić wiodąca charakteryzuje się mniej stabilną strukturą tworzoną przez koniec 5', natomiast druga z nici, tzw. nić pasażerska (ang. *passenger strand*) charakteryzuje się bardziej stabilnym końcem 5'. Nić wiodąca jest wiązana przez białko Argonaute 2 (Ago2), natomiast nić pasażerska oddysocjowuje z kompleksu i ulega degradacji. Usunięcie nici pasażerskiej z kompleksu inicjuje powstanie aktywnego kompleksu RISC. Oprócz białka Ago2 i nici efektorowej w skład tego kompleksu mogą wchodzić takie białka jak Dicer, MOV10 i helikaza RNA A [46-49]. Warto zaznaczyć, iż cechą odróżniającą działanie komórkowych miRNA i siRNA w kompleksie RISC jest stopień ich komplementarności wobec mRNA oraz miejsce oddziaływania z sekwencją docelową. W przypadku kompleksu RISC załadowanego nicią wiodącą miRNA (miRISC, ang. *RISC with incorporated miRNA*) do regulacji ekspresji genów dochodzi w wyniku wiązania się miRNA do komplementarnej sekwencji mRNA. Najczęściej miejsce wiązania miRNA występuje w rejonie 3' UTR (ang. *untranslated region*) transkryptów, jednakże niektóre doniesienia literaturowe wskazują na możliwość występowania takich miejsc w obrębie sekwencji kodujących białko [50-52]. Kluczową rolę w oddziaływaniu pomiędzy miRNA, a mRNA odgrywa tzw. rejon źródłowy miRNA (ang. *seed region*). W dojrzałej cząsteczce miRNA jest to sekwencja o długości ~7 nt, zlokalizowana pomiędzy 2 i 8 nukleotydem od końca 5' miRNA. Połączenie rejonu źródłowego i komplementarnego miejsca rozpoznającego miRNA (MRE, ang. *miRNA recognition elements*) w obrębie rejonu 3' UTR docelowego mRNA powoduje zahamowanie procesu translacji poprzez blokowanie przyłączenia podjednostek rybosomów lub ich przedwczesną dysocjację oraz deadenylację mRNA [53-56]. U zwierząt pełna komplementarność pomiędzy cząsteczką miRNA, a MRE jest bardzo rzadka (u roślin dominująca), a częściowa komplementarność miRNA zwiększa pulę docelowych transkryptów mRNA [57]. W przypadku kompleksu RISC załadowanego nicią wiodącą siRNA (ang. *siRNA-induced silencing complex*) dochodzi do pełnego sparowania siRNA z docelowym mRNA. Po utworzeniu kompleksu siRNA-mRNA dochodzi do degradacji mRNA, w wyniku aktywności endonukleazowej białka Ago2 [58-60]. Do przecięcia mRNA przez białko Ago dochodzi w rejonie komplementarnym do siRNA, pomiędzy 10 i 11 nukleotydem, licząc od końca 5' siRNA [61].

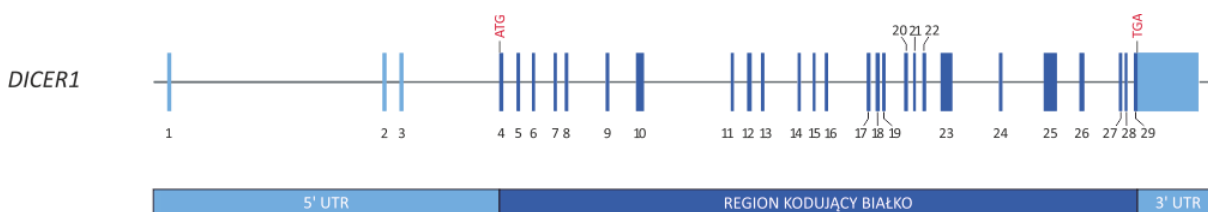
Podsumowując, obecne w kompleksie RISC cząsteczki miRNA oraz siRNA pełnią funkcję „przewodnika molekularnego” dla białka Ago w odszukiwaniu komplementarnych sekwencji znajdujących się w transkryptach genów. Po związaniu się aktywnego kompleksu RISC z sekwencją docelową następuje uruchomienie kaskady sygnałów prowadzących do wyciszenia ekspresji konkretnych genów poprzez inhibicję translacji, deadenylację lub degradację transkryptu mRNA [62-64].

1.3 Budowa i model działania ludzkiej rybonukleazy Dicer

Jak opisano powyżej ważną rolę w procesie biogenezy srRNA odgrywa rybonukleaza Dicer, która wycina dupлексы miRNA z jednoniciowych prekursorów przyjmujących strukturę spinki (pre-miRNA) oraz siRNA z długich dwuniciowych cząsteczek RNA [10].

Ludzka Dicer (hDicer) jest dużym (~220 kDa), wielodomenowym białkiem zbudowanym z 1922 aminokwasów (aa) tworzących kolejno następujące po sobie domeny: N-końcową domenę helikazową, domenę o nieznannej funkcji DUF283 (ang. *domain of unknown function 283*), domeny: Platformy, PAZ (ang. *Piwi-Argonaute-Zwille*) oraz helisy łączącej nazywanych także kasetą PPC (ang. *Platform-PAZ-Connector helix cassette*), dwie domeny RNazy III (RNaza IIIa i RNaza IIIb) oraz C-końcową domenę wiążącą dwuniciowy RNA dsRBD (ang. *double-stranded RNA binding domain*) [27, 28, 65, 66].

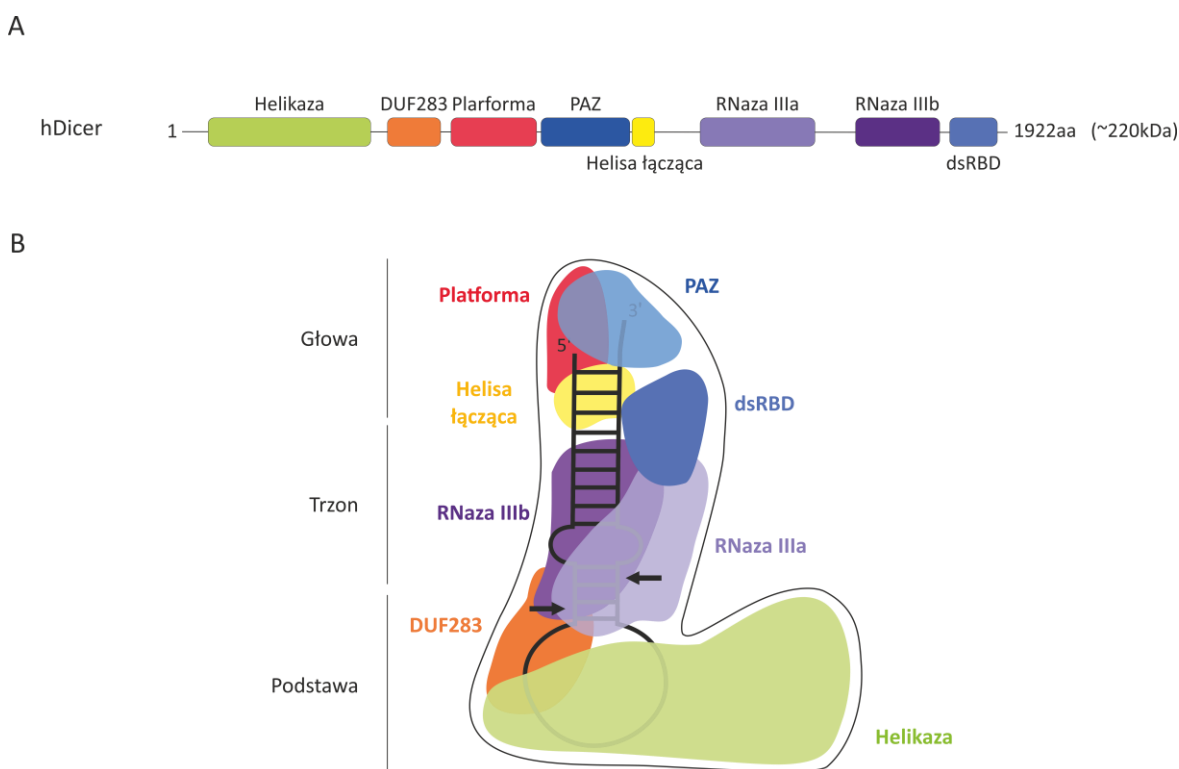
hDicer jest kodowana przez gen *DICER1* (ENST00000526495.6), który jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 14, w rejonie subtelerowym (14q32.13). Gen ten zawiera 29 egzonów i jest uznawany za gen metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gen*), jednakże w porównaniu do innych tego typu genów, *DICER1* charakteryzuje się dłuższym rejonem 3' UTR (>4000 pz). Schemat organizacji genu *DICER1* przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Schematyczna organizacja genu *DICER1*. Pionowymi liniami oznaczono poszczególne egzony *DICER1*.

Obecnie w bazie danych Ensembl znaleźć można 7 izoform mRNA kodujących białko hDicer pełnej długości. Izoformy te powstają m.in. w procesie alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *DICER1* i różnią się między sobą długością regionów 5' oraz 3' UTR [67].

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM) wykazały, iż trzeciorzędowa struktura hDicer przypomina kształtem literę L, z domeną helikazową u podstawy, domeną PAZ na przeciwległym końcu oraz tandemem domen RNazy III znajdujących się w rdzeniu [45, 68-71] (Rysunek 4B). Dane strukturalne wraz z wynikami badań aktywności biochemicznych umożliwiły zaproponowanie modelu funkcjonowania hDicer. Zgodnie z nim podczas wiązania substratu dochodzi do znacznych zmian konformacyjnych obejmujących całą cząsteczkę białka, a duża elastyczność struktury enzymu umożliwia wiązanie cząsteczek RNA o zróżnicowanej budowie takich jak pre-siRNA oraz pre-miRNA [27, 68, 71-73].



Rysunek 4. Schemat budowy ludzkiej rybonukleazy Dicer. Ułożenie domen w strukturze pierwszorzędowej białka (A). Przestrzenne ułożenie domen w strukturze trzeciorzędowej białka w kompleksie z cząsteczką pre-miRNA (B). Czarnymi strzałkami zaznaczono miejsce hydrolizy substratu przez domeny RNazy III. Rysunek na podstawie Liu i wsp. [74].

Centrum katalityczne enzymu jest tworzone przez wewnątrzcząsteczkowy dimer domen RNazowych, które działają niezależnie od siebie. Domena RNazy IIIa hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w obrębie ramienia 3', natomiast domena RNazy IIIb hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w obrębie ramienia 5' substratu RNA. Produktem hydrolizy jest dupleks RNA z dwoma niesparowanymi nukleotydami i resztą hydroksylową na końcu 3' oraz grupą fosforanową na końcu 5'. Reakcja hydrolizy katalizowana przez Dicer jest zależna od dwuwartościowych jonów metalu koordynowanych w centrum aktywnym enzymu, głównie Mg^{2+} [75-77]. Analizy krystalograficzne domen RNazy III hDicer wykazały obecność dwóch dwuwartościowych jonów magnezu w centrum aktywnym enzymu [78]. Wiązanie pierwszego jonu zachodzi w obrębie czterech wysoce konserwatywnych reszt aminokwasowych (dwie reszty kwasu glutaminowego i dwie reszty kwasu asparaginowego). Jon ten jest zaangażowany w hydrolizę substratu. Drugi jon jest zaangażowany w wiązanie substratu [73, 74, 78]. Dystans pomiędzy miejscami wiązania jonów dwuwartościowych w poszczególnych domenach wynosi $\sim 17,5$ Å, co odpowiada szerokości rowka w rejonie katalitycznym enzymu, w którym wiązany jest substrat [28]. Obecność dwuwartościowych jonów metali nie jest jednak konieczna do rozpoznawania i wiązania substratów RNA przez rybonukleazę Dicer [79, 80].

1.4 Udział domen rybonukleazy hDicer w wiązaniu substratu pre-miRNA

Istotną rolę w oddziaływaniu hDicer z substratem RNA odgrywają domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej (kaseta PPC). W obrębie domeny PAZ występuje tzw. kieszeń wiążąca 3' (ang. *3' binding pocket*), która rozpoznaje i wiąże dwunukleotydowy niesparowany koniec 3' substratu (pre-miRNA oraz pre-siRNA) [28, 58, 81, 82]. Natomiast grupa fosforanowa na końcu 5' substratu wiązana jest w tzw. kieszeni wiążącej 5' (ang. *5' binding pocket*) występującej w obrębie domeny Platformy i PAZ [83, 84]. Wiązanie końca 5' substratu w obrębie kieszeni 5' hDicer możliwe jest w przypadku substratów pre-miRNA, które to w przeciwieństwie do substratów pre-siRNA, charakteryzują się mniejszą stabilnością termodynamiczną końców i łatwo ulegają rozplataniu [84].

Dostępne struktury białek typu Dicer wskazują, iż odległość domeny PAZ od centrum katalitycznego enzymu determinuje długość fragmentów RNA generowanych przez Dicer [69, 74, 85]. Kluczowym elementem strukturalnym determinującym tę odległość jest helisa α zlokalizowana w domenie helisy łączącej, która w strukturze trzeciorzędowej białka lokuje się pomiędzy domeną PAZ i domenami RNazy III [86]. W związku z tym, helisa łącząca jest określana często jako „linijka molekularna” (ang. *molecular ruler*). Generowane przez hDicer

miRNA/siRNA mają długość ~22 nt [87, 88]. Najnowsze dane literaturowe wskazują, iż kluczowy wpływ na generowanie produktów cięcia pre-miRNA o długości ~22 nt przez hDicer ma również motyw sekwencyjny GYM występujący pod pętlą apikalną w strukturze pre-miRNA (Rysunek 2). Obecność, jak i lokalizacja motywu GYM w sekwencji pre-miRNA mają nadrzędną rolę w wyborze miejsca cięcia substratu przez hDicer oraz istotnie zwiększają wydajność ich cięcia [30, 73].

Wiązanie substratu RNA przez hDicer wspierane jest także przez domenę dsRBD zlokalizowaną na końcu C białka. Domena ta charakteryzuje się wysokim powinowactwem do kanonicznych substratów Dicer (pre-miRNA oraz dsRNA) [89, 90]. Dodatkowo domena dsRBD bierze udział w specyficznym rozpoznawaniu motywu GYM, przez co odgrywa pomocniczą rolę w wyborze miejsca cięcia substratu przez hDicer [30, 73].

Domena helikazowa jest zaangażowana w oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA, co pozwala na dopasowanie tego substratu do centrum katalitycznego enzymu, a także na dyskryminację pomiędzy substratami pre-miRNA i dsRNA [90]. Co więcej, domena helikazowa pełni rolę regulatorową, ponieważ stanowi platformę do interakcji z białkami wpływającymi na aktywność Dicer [91, 92]. Przykładem takiej interakcji jest oddziaływanie domeny helikazowej hDicer z białkiem TRBP. Białko TRBP wpływa na wybór miejsca przecięcia cząsteczki pre-miRNA przez hDicer, jak również zwiększa powinowactwo hDicer do dwuniciowych substratów RNA oraz wydajność ich cięcia [93-96]. Ponadto, białko TRBP wspiera tworzenie kompleksu RISC i przekazywanie kompleksu miRNA do białka Ago [43-45, 93, 97]. Usunięcie domeny helikazowej zwiększa procesywność enzymu w warunkach *in vitro* [72, 73, 98]. Dodatkowo, najnowsze dane strukturalne wskazują, że domena helikazowa uczestniczy wyłącznie w fazie rozpoznawania i wiązania substratu przez hDicer, natomiast nie uczestniczy bezpośrednio w procesie cięcia substratu [72, 73].

Rola domeny DUF283 w wiązaniu substratu RNA przez hDicer nie została jednoznacznie określona. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, iż domena ta wiąże jednoniciowe cząsteczki RNA i DNA oraz wspiera ich hybrydyzację do komplementarnych nici kwasów nukleinowych [99]. Aktywność domeny DUF283 może wskazywać na funkcje opiekuńcze hDicer [99]. Ponadto, najnowsze dane strukturalne wskazują, iż po związaniu substratu pre-miRNA do kasety PPC, domeny DUF283 oraz helikazowa odginają się, co wiąże się z przyjęciem przez Dicer konformacji otwartej i cięciem substratu [73]. Badania przeprowadzone z wariantem delecyjnym hDicer pozbawionym domeny DUF283 wykazały, iż

otrzymany wariant generował produkty cięcia o różnej długości, w zależności od struktury pre-miRNA. Wyniki te mogą wskazywać, iż usunięcie domeny DUF283 mogło zaburzyć właściwe ułożenie domeny helikazowej w strukturze trzeciorzędowej białka, powodując zaburzenie procesu rozpoznawania i wiązania substratów pre-miRNA przez hDicer [100].

1.5 Funkcje Dicer niepowiązane ze szlakiem biogenezy krótkich regulatorowych RNA

Funkcja rybonukleazy Dicer najczęściej omawiana jest w kontekście biogenezy krótkich regulatorowych RNA, jednakże coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje na funkcje Dicer niepowiązane ze ścieżkami biogenezy miRNA i siRNA.

Na specyficzność działania Dicer mają wpływ białka oddziałujące z tą rybonukleazą. Przykładem białek partnerujących Dicer jest 5-lipooksygenaza (5LO), która wiąże się do C-końcowego fragmentu hDicer [101]. 5LO bierze udział w biosyntezie przekaźników zapalnych, umożliwiając tym samym uruchomienie procesów zapalnych w organizmie. U człowieka, 5LO głównie ulega ekspresji w zróżnicowanych komórkach zapalnych (np. w limfocytach B, makrofagach, granulocytach), gdzie katalizuje dwa pierwsze etapy biosyntezy leukotrienów — silnych mediatorów stanu zapalnego [102]. Zauważono, iż wiązanie 5LO do C-końcowego fragmentu hDicer nie tylko zwiększa aktywność katalityczną 5LO, ale również wpływa na sposób cięcia pre-miRNA przez hDicer. W kompleksie z 5LO, hDicer generuje cząsteczki o długości ~10-12 nt i ~55 nt [101]. Generowanie przez hDicer takiej długości produktów może być związane z rearanżacją struktury hDicer w wyniku jej oddziaływania z 5LO. Charakter oddziaływań 5LO-hDicer, jak i funkcja powstających cząsteczek RNA są nieznane, jednakże wyniki zaprezentowanych badań wskazują na udział hDicer w procesach zapalnych [101].

Oprócz czynników białkowych, także cząsteczki RNA mogą wpływać na aktywność rybonukleaz Dicer [80, 103, 104]. Badania transkryptomu komórek HEK293T oraz nicienia *Caenorhabditis elegans* przeprowadzone przez grupę prof. Rajewskiego, pozwoliły na zidentyfikowanie tzw. „rejonów pasywnych” Dicer — sekwencji RNA przyjmujących strukturę typu spinki do włosów i wiążących Dicer [103]. Miejsca te zlokalizowane są głównie w obrębie cząsteczek mRNA i długich niekodujących RNA (lncRNA, ang. *long non-coding RNA*). Zauważono, iż Dicer rozpoznaje i wiąże takie sekwencje, jednakże po ich związaniu nie dochodzi do cięcia transkryptu przez Dicer. Postuluje się, że rejon pasywny może sekwestrować Dicer i tym samym kontrolować poziom aktywnej rybonukleazy Dicer

w cytoplazmie [103]. Domniemywa się, iż wiązanie się rybonukleazy Dicer do miejsc pasywnych odbywa się przy udziale domeny helikazowej, a nie kasety PPC jak w przypadku wiązania kanonicznych substratów. Podobny mechanizm oparty na ograniczeniu dostępności aktywnej Dicer w komórce wykorzystują niektóre adenowirusy [105, 106]. Sekwestracja Dicer przez cząsteczki wirusowego RNA uniemożliwia produkcję komórkowych miRNA zaangażowanych w odpowiedź przeciwwirusową komórki [105, 106].

Szereg prac wskazuje, iż hDicer może lokalizować się nie tylko w cytoplazmie, ale także w jądrze komórkowym, gdzie bierze udział w szeregu procesów. Przykładem może być udział Dicer w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, jak i w procesie odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA Damage Response*) oraz naprawie dwuniciowych pęknięć DNA [107-112]. Dodatkowo, ze względu na zidentyfikowane oddziaływanie z receptorami jądrowymi, hDicer może stymulować transkrypcję genów zawierających w rejonach promotorowych sekwencje odpowiedzi na hormony steroidowe (ang. *steroid response elements*) [107]. Wykazano także, iż jądrowa hDicer uczestniczy w procesie degradacji dsRNA będących produktami transkrypcji zbieżnej, a także potencjalnie szkodliwych dla komórek transkryptów ruchomych elementów genetycznych [113]. Lokalizację jądrową Dicer zaobserwowano również u innych gatunków organizmów. Z danych literaturowych wiadomo, że jądrowa Dicer u roślin i drożdży jest zaangażowana w proces tworzenia heterochromatyny [114]. Zaobserwowano także, że u nicienia *C. elegans* białko Dicer bierze udział w procesie rearanżacji chromatyny w wyniku odpowiedzi na promieniowanie UV [115]. U myszy, lokalizację jądrową Dicer zaobserwowano w komórkach rozrodczych, gdzie podczas spermatogenezy kontroluje ekspresję heterochromatyny pericentrycznej [116].

Należy podkreślić, iż mechanizm transportu Dicer z cytoplazmy do jądra nie został w pełni poznany. Analiza sekwencji aminokwasowej hDicer umożliwiła zidentyfikowanie w obrębie domeny dsRBD tzw. sygnału lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localisation signal*) rozpoznawanego przez importyny β zlokalizowane w cytoplazmie [117]. Dodatkowo zaobserwowano, że duplikacja domeny dsRBD lub usunięcie N-końcowej domeny helikazowej skutkuje akumulacją Dicer w jądrze komórkowym [117]. Jednakże lokalizacja cytoplazmatyczna Dicer wskazuje, iż w przypadku białka pełnej długości sygnał NLS jest maskowany przez pozostałe domeny Dicer lub nieznany czynnik białkowy [117]. Translokacja Dicer do jądra komórkowego związana jest również z fosforylacją reszt seryny w obrębie kasety PPC, domen RNazy III i dsRBD [111, 118, 119].

Szczególne zainteresowanie wzbudzają funkcje naturalnie występujących w komórkach wariantów Dicer nie posiadających wszystkich domen, tzw. „skróconych form” Dicer. Formy te mogą występować obok białka pełnej długości zarówno w komórkach prawidłowych, jak i w komórkach nowotworowych. Przykładowo, w mysich oocytach wykazano obecność skróconej formy Dicer pozbawionej domeny helikazowej. Wariant ten powstaje na skutek alternatywnego składania pierwotnego transkryptu kodującego białko pełnej długości w wyniku insercji retrotranspozonu MT (ang. *mouse transcript*) z rodziny LTR (ang. *long terminal repeat*) w obrębie intronu szóstego genu *DICER1* [120]. W porównaniu do białka Dicer pełnej długości, powstały wariant pozbawiony domeny helikazowej wykazywał większą efektywność cięcia dsRNA do siRNA [120]. Co ciekawe, przeprowadzone badania *in vitro* z udziałem hDicer wykazały, iż obecność domeny helikazowej obniża aktywność RNazy wobec prekursorów siRNA [98]. Przypuszcza się, iż rolą wariantu Dicer pozbawionego domeny helikazowej u ssaków jest ochrona komórek macierzystych przed infekcją wirusową [121].

U ludzi, skrócony wariant hDicer o nazwie t-Dicer został zidentyfikowany w komórkach nerwiaka [122]. Wariant ten, podobnie jak u myszy powstaje na skutek alternatywnego składania pierwotnego transkryptu kodującego białko pełnej długości. Porównanie sekwencji aminokwasowej hDicer i t-Dicer wykazało, iż t-Dicer nie zawiera ostatnich, C-końcowych, 93 aminokwasów, w wyniku czego powstałe białko nie zawiera C-końcowej domeny dsRBD, a także posiada domenę RNazy IIIb pozbawioną reszty katalitycznej w pozycji E1813 [122]. Przeprowadzone analizy wykazały, iż t-Dicer nie generowała produktów cięcia z ramienia 5' pre-miRNA, a generowanie produktów cięcia z ramienia 3' substratu było znacznie mniej wydajne, w porównaniu do generowania odpowiednich produktów cięcia przez białko pełnej długości [123]. Postuluje się, iż brak generowania miRNA-5p przez t-Dicer jest związany z brakiem funkcjonalnej domeny RNazy IIIb oraz zmianą konformacyjną białka skutkującą nieoptymalną rearanżacją struktury enzymu [123].

Skrócone warianty Dicer zaobserwowano również w komórkach raka piersi [124]. Warianty te zostały opisane jako: (i) wariant Dicer d (113 kDa), obejmujący domenę Platformy, PAZ i domenę RNazy IIIa; oraz (ii) wariant Dicer e (93 kDa), obejmujący obie domeny RNazy III i domenę dsRBD. Należy zaznaczyć, iż obecność izoform Dicer d i e stwierdzono w komórkach raka piersi o fenotypie epithelialnym (nabłonkowym), natomiast izoformy te zanikają wraz z wejściem komórek w proces transformacji epithelialno-mezenchymalnej (EMT,

ang. *epithelial to mesenchymal transition*) i nie są one obecne w komórkach o fenotypie mezenchymalnym (komórki bardziej ruchliwe, inwazyjne, przerzutujące) [124].

Wariant Dicer1e został wstępnie scharakteryzowany w 2014 roku na łamach czasopisma *Molecular Cancer*. W przedstawionym artykule wariant ten został określony jako Dicer1e [125]. Autorzy wykazali, że Dicer1e powstaje w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *DICER1*. Translacja wariantu Dicer1e rozpoczyna się w egzonie 22. Podczas alternatywnego składania pierwotnego transkryptu dochodzi do wycięcia początkowego fragmentu egzonu 23, w wyniku czego dochodzi do zmiany ramki odczytu. Zmiana ramki odczytu powoduje, iż powstające białko Dicer1e posiada zmienioną sekwencję początkową (o długości 13 aminokwasów). Dicer1e posiada tylko domeny RNazy IIIa i IIIb oraz domenę dsRBD. Wykazano, iż wariant Dicer1e obecny jest w komórkach raka płaskonabłonkowego języka o fenotypie epitelialnym, jak i mezenchymalnym oraz jest zlokalizowany w jądrze komórkowym. Obecność białka Dicer1e zaobserwowano również w sąsiadujących komórkach prawidłowych (zdrowych), jednakże jego poziom był znacząco niższy, w porównaniu do komórek nowotworowych. Ponadto, zaobserwowano, że obniżenie poziomu białka Dicer1e znacząco hamowało proliferację komórek nowotworowych. Autorzy zasugerowali, że zaobserwowane wyniki mogą wskazywać, iż brak Dicer1e w komórkach nowotworowych może promować apoptozę lub zatrzymanie cyklu komórkowego w interfazie (uniemożliwiając komórce przejście mitozy). Co więcej, brak izoformy Dicer1e zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na traktowanie cisplatiną (czynnik hamujący proliferację komórek), jednakże mechanizm molekularny stojący za tym efektem nie został jeszcze poznany [125].

Podobną do ludzkiej Dicer1e izoformę Dicer pod względem wielkości, jaki i składu domen zaobserwowano w komórkach nicienia *C. elegans* [126]. U nicienia izoforma ta określana jest jako sDCR-1, jednakże powstaje ona w wyniku proteolitycznego cięcia Dicer pełnej długości. Wykazano, że zwiększenie poziomu białka sDCR-1 w komórkach skutkuje akumulacją pre-miRNA oraz zahamowaniem powstawania dojrzałego miRNA. Co więcej, akumulacja prekursorów miRNA była także zauważalna wraz z wprowadzeniem do komórek egzogennych cząsteczek dsRNA. Dodatkowo, sDCR-1 immunoprecypitowała z białkami Argonaute ALG-1 i ALG-2. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki zaproponowano model funkcjonowania szlaku interferencji RNA u *C. elegans*, w którym to białko sDCR-1: (i) wzmacnia szlak interferencji RNA indukowany egzogennymi cząsteczkami dsRNA poprzez wyższą aktywność katalityczną względem tych cząsteczek w porównaniu do Dicer pełnej

długości oraz (ii) jest inhibitorem kompetycyjnym białek Argonaute w komórce powodując akumulację prekursorów miRNA i redukcję dojrzałych miRNA [126].

Kolejnym przykładem naturalnie występującej izoformy Dicer jest wariant zidentyfikowany w komórkach małży *Crassostrea gigas* [127]. W komórkach małży, obok białka Dicer pełnej długości, zidentyfikowano wariant Dicer (CgDCL) obejmujący tylko domenę helikazową. Co ciekawe, analiza sekwencji aminokwasowej wykazała wysokie podobieństwo formy CgDCL do białek z rodziny RLR. Białka RLR (ang. *RIG-I-like receptors*), nazywane również helikazami RIG-I-podobnymi (RLH, ang. *RIG-I-like helicases*), to rodzina wewnątrzkomórkowych receptorów rozpoznających wirusowy ssRNA i dsRNA obecny w cytoplazmie podczas infekcji i replikacji wirusa. U kręgowców, receptory RLR, po związaniu odpowiedniego liganda, uruchamiają złożony i wieloetapowy szlak sygnałowy prowadzący do aktywacji odpowiedzi odpornościowej związanej z syntezą interferonu. Zaobserwowano, iż w wyniku inkubacji małży z dsRNA oraz białkiem podobnym do interferonu dochodziło do wzrostu poziomu mRNA CgDCL w hemocytach małży. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że CgDCL wykazywała zdolność do wiązania dsRNA, jednakże nie wykazywała aktywności nukleazowej względem tych cząsteczek. Badacze sugerują, iż w komórkach *C. gigas* skrócony wariant Dicer wiąże egzogenne cząsteczki RNA oraz jest zaangażowany w przeciwwirusową obronę immunologiczną [127].

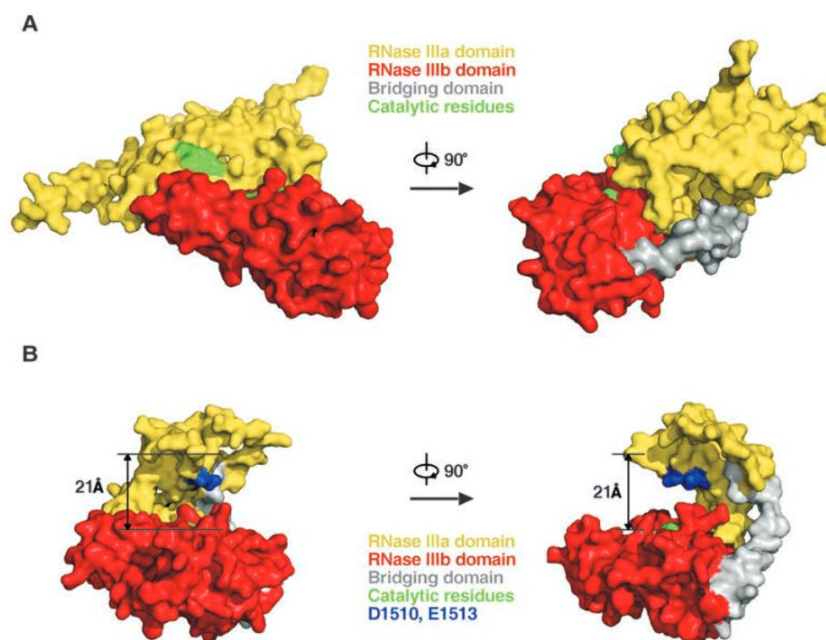
1.6 Aktywność DNazowa rybonukleazy Dicer

Wśród funkcji rybonukleazy Dicer niepowiązanych z biogenezą srRNA szczególne zainteresowanie wzbudza aktywność DNazowa Dicer. W 2010 roku na łamach czasopisma *Science* pokazano, iż w komórkach nicienia *C. elegans* uwalniana podczas procesu apoptozy kaspaza 3 (CED-3) przecina Dicer w obrębie domeny RNazy IIIa, pomiędzy kwasem asparaginowym w pozycji 1472 a glicyną w pozycji 1473 [128]. W wyniku przecięcia Dicer przez CED-3 powstają dwa fragmenty: (i) N-końcowy o masie około 193 kDa, obejmujący domenę helikazową, PAZ oraz fragment domeny RNazy IIIa oraz (ii) C-końcowy o masie 43 kDa, obejmujący pozostały fragment domeny RNazy IIIa, domenę RNazy IIIb i domenę dsRBD (tDCR-1). Wykazano, że przecięcie Dicer przez CED-3 znosi aktywność RNazową Dicer wobec substratów dsRNA. Co ciekawe, testy cięcia dwuniciowego DNA (dsDNA, ang. *double-stranded DNA*) z wykorzystaniem tDCR-1 pokazały, że fragment ten wykazuje zdolność do nacięcia jednej z nici w duplesie DNA — tzw. aktywność nikazy [128]. Co więcej, komórki ze zwiększonym poziomem tDCR-1 charakteryzowały się znaczącym

wzrostem pęknięć i fragmentacji w obrębie chromosomalnego DNA [129]. Uzyskane wyniki wskazują, że powstająca podczas apoptozy komórkach nicienia *C. elegans*, skrócona forma Dicer (tDCR-1) posiada zdolność do promowania tego procesu, poprzez inicjację apoptotycznej degradacji DNA w jądrze komórkowym [128, 129].

Warto przypomnieć, że cięcie dwuniciowego substratu RNA przez rybonukleazę Dicer wymaga obecności dwóch domen RNazy III (RNazy IIIa i IIIb), przy czym każda z domen hydrolizuje jedną z nici dupleksu RNA w obrębie centrum katalitycznego zawierającego osiem wysoce konserwatywnych reszt aminokwasowych (po cztery na każdą domenę RNazową) [27]. Przecięcie Dicer w obrębie domeny RNazy IIIa przez CED-3 powoduje utratę dwóch, z czterech reszt katalitycznych w domenie RNazy IIIa, a tym samym zakłóca tworzenie stabilnego wewnątrzcząsteczkowego dimeru [128]. Po przeprowadzeniu modelowania trzeciorzędowej struktury Dicer przed i po cięciu przez CED-3, zaobserwowano zasadniczą zmianę konformacji domeny RNazy IIIa (Rysunek 5).

W modelu dla pełnej długości Dicer dwie domeny RNazy III tworzą wewnątrzcząsteczkowy dimer. Dwa katalityczne miejsca, z których każde zawiera cztery reszty kwasowe, są odsłonięte na powierzchni płytkiego rowka białka i oddalone od siebie o ~ 20 Å, co jest optymalne dla związania substratu dsRNA (Rysunek 5A). Przecięcie Dicer w obrębie domeny RNazy IIIa przez CED-3, skutkuje rotacją pozostałej części domeny RNazy IIIa z jej pierwotnej pozycji w kierunku domeny RNazy IIIb, generując głębszy i węższy rowek z szczeliną o szerokości około 21 Å. Domena RNazy IIIb nie wykazuje znaczących zmian strukturalnych. Autorzy zasugerowali, iż zmiany strukturalne w obrębie skróconej domeny RNazy IIIa spowodowały rearanżację struktury tDCR-1, umożliwiając związanie i hydrolizę substratu dsDNA [129].



Rysunek 5. Model strukturalny DCR-1 przed i po cięciu przez CED-3. Struktura DCR-1 z kompletnymi domenami RNazy IIIa i IIIb, które są zaznaczone odpowiednio kolorem żółtym i czerwonym (A). Reszty katalityczne zaznaczono kolorem zielonym. Struktura DCR-1 po przecięciu przez CED-3 (B). Kolorem niebieskim zaznaczono dwie reszty katalityczne w pozostałym fragmencie domeny RNazy IIIa. W wyniku przecięcia przez CED-3, pozostały fragment domeny RNazy IIIa przemieszcza się względem domeny RNazy IIIb, tworząc rowek o szerokości szczeliny ~ 21 Å, umożliwiając związaną dsDNA. Rysunek pochodzi z publikacji Ge i wsp. [129].

Jak dotąd nie udało się wykazać występowania aktywności DNazowej u Dicer kręgowców. W przypadku hDicer, przeprowadzono podobne badania jak dla Dicer z nicienia *C. elegans* [130]. W badaniach tych wykorzystano komórki raka szyjki macicy (HeLa). W wyniku indukcji procesu apoptozy czynnikiem martwicy nowotworu alfa ($\text{TNF}\alpha$) oraz cykloheksymidem zaobserwowano zanik hDicer pełnej długości i pojawienie się fragmentu Dicer o masie ~ 185 kDa [130]. Na podstawie analiz sekwencji aminokwasowej białka zidentyfikowano miejsce rozpoznawane przez kaspazę 3/7, znajdujące się pomiędzy domenami RNazy III, dokładniej pomiędzy kwasem asparaginowym w pozycji 1644 a alaniną w pozycji 1645. Dodatkowo zaobserwowano, że komórki HeLa z wyciszoną ekspresją genu *DICER1* były bardziej wrażliwe na traktowanie czynnikami proapoptocznymi (etopozydem, chelerytryną, staurosporyną) [130]. Otrzymane wyniki mogą wskazywać, iż obniżenie poziomu endogennej Dicer promuje proces apoptozy, jednakże mechanizm molekularny leżący u podstaw tego procesu nie został jeszcze wyjaśniony. Ponadto, przecięcie hDicer przez aktywne kaspazy 3/7 podczas procesu apoptozy

może wpływać na poziom generowanych miRNA w komórce [130]. Niemniej jednak, aktywność tak skróconej formy hDicer nie została do tej pory poznana.

2. Cel pracy

Biorąc pod uwagę dane literaturowe dotyczące aktywności DNazowej skróconej formy Dicer *C. elegans* (tDCR-1), pozbawionej domeny helikazowej, DUF283 oraz kasety PPC, zadano pytanie: **czy hDicer oraz jej skrócone formy również posiadają potencjał do hydrolizy substratów DNA?**

W celu odpowiedzi na zadane pytanie, wyznaczono następujące zadania badawcze:

1. Otrzymanie skróconych form hDicer, pozbawionych: (i) domeny helikazowej (Δ Helikaza), (ii) domeny DUF283 (Δ DUF283), (iii) domeny helikazowej oraz DUF283 (Δ Helikaza-DUF283), (iv) domeny PAZ (Δ PAZ) oraz (v) całej kasety PPC (Δ PPC).
2. Zbadanie potencjalnej aktywności DNazowej hDicer oraz otrzymanych wariantów hDicer.

Drugi nurt badawczy poświęcony był analizie skróconych form hDicer powstających w komórkach i próbie zdefiniowania ich funkcji. Analizy transkryptomiczne pozwoliły na zidentyfikowanie szeregu skróconych wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1*. Wśród nich zidentyfikowano wariant opisany w literaturze jako *Dicer1e*. Wariant ten powstaje w wyniku procesu alternatywnego składowania pierwotnego transkryptu genu *DICER1*. Białko Dicer1e, w odróżnieniu od hDicer, posiada unikatowy koniec N oraz zaledwie trzy domeny: RNazy IIIa, RNazy IIIb oraz dsRBD. Jak dotąd, nie scharakteryzowano aktywności biochemicznych białka Dicer1e. Kolejnym celem niniejszej pracy doktorskiej było **zbadanie aktywności nukleazowej wariantu Dicer1e i zaproponowanie potencjalnej funkcji biologicznej tej skróconej formy hDicer.**

Osiągnięcie tego celu wymagało realizacji następujących zadań badawczych:

1. Otrzymania konstrukcji genowej niosącej sekwencję kodującą wariant Dicer1e.
2. Otrzymania białka Dicer1e.
3. Zbadania aktywności RNazowej wariantu Dicer1e, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in cellulo*.
4. Zbadania potencjalnej aktywności DNazowej wariantu Dicer1e.
5. Analizy porównawczej profilu ekspresji genów pomiędzy komórkami produkującymi i nieprodukującymi wariant Dicer1e.
6. Zaproponowania, w oparciu o uzyskane wyniki, potencjalnej funkcji biologicznej wariantu Dicer1e.

3. Materiały

3.1 Linie komórkowe

- ❖ HEK293T — linia ludzkich embrionalnych komórek typu epitelialnego pochodzących z nerki (ang. *human embryonic kidney*), z wprowadzonym dużym antygenem T wirusa SV40.
- ❖ HEK293T No_Dice — linia komórek HEK293T z mutacją typu *knock out* we wszystkich trzech kopiach genu *DICER1*, w wyniku czego w komórkach tych nie powstaje endogenna Dicer [67].
- ❖ HeLa — linia ludzkich komórek typu epitelialnego pochodzących z raka szyjki macicy.

3.2 Szczepy bakteryjne

- ❖ *Escherichia coli* szczep DH5 α o genotypie F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1, charakteryzujący się wysoką wydajnością transformacji.

3.3 Pożywki

Medium do hodowli komórek HEK293T:

- 500 ml DMEM, high glucose (Gibco)
- 50 ml Fetal Bovine Serum HI (FBS) (EURx)
- 5ml Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL) (Gibco)
- 5 ml Sodium Pyruvate (100 mM) (Gibco)

Medium do transfekcji komórek HEK293T:

- Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco)

Medium bakteryjne LB Broth Miller, pH 7,0:

- 10 g Bacto-trypton

5 g Ekstrakt drożdżowy

10 g NaCl

Woda do 1000 ml

W przypadku przygotowania pożywki stałej, przed autoklawowaniem dodano 15 g agaru bakteryjnego.

3.4 Wektory i konstrukcje genowe

- ❖ *cDNA hsDicer* (GeneCopoeia) — konstrukcja zawierająca pełną sekwencję DNA genu *DICER1* (NM_030621) wraz z sekwencjami 5' i 3' UTR w wektorze pBluescriptR. Wektor zawiera gen oporności na ampicylinę w bakteriach. Wektor wykorzystywany jako matryca w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do amplifikacji fragmentów DNA hDicer.
- ❖ wektor *SureVector* (Agilent) — wektor do produkcji białek na wysokim poziomie w komórkach ssaczych. Umożliwia uzyskanie konstruktów fuzyjnego badanego genu z sekwencją kodującą znacznik 3x Flag Tag na końcu 3' pod kontrolą silnego promotora CMV. Wektor zawiera gen oporności na ampicylinę w bakteriach oraz gen oporności na puromycynę w komórkach ssaczych.
- ❖ *hDicer_ΔPPC::3xFlag* — konstrukcja genowa zawierająca fragment DNA genu *DICER1* z delecją sekwencji kodującej domeny: Platformy, PAZ i helisy łączącej (aminokwasy 753-1068) ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 3' w wektorze SureVector. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych.
- ❖ *hDicer_ΔDUF283(625-752aa)::3xFlag* — konstrukcja genowa zawierająca fragment DNA genu *DICER1* z delecją w obrębie sekwencji kodującej domenę DUF283 (aminokwasy 625-752) ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 3' w wektorze SureVector. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych.
- ❖ *hDicer_ΔDUF283(630-709aa)::3xFlag* — konstrukcja genowa zawierająca fragment DNA genu *DICER1* z delecją w obrębie sekwencji kodującej domenę DUF283 (aminokwasy 630-709) ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 3' w wektorze SureVector. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych.

- ❖ *pcDNA3.1-FLAG-Dicer-ΔDUF* (#51365, Addgene) — konstrukcja genowa zawierająca fragment DNA genu *DICER1* pozbawiony sekwencji kodującej domeny helikazową i DUF283 ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 5' w wektorze pcDNA3.1. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych na wysokim poziomie [131].
- ❖ *pcDNA3.1-FLAG-Dicer-ΔHelicC* (#51366, Addgene) — konstrukcja genowa zawierająca fragment DNA genu *DICER1* pozbawiony sekwencji kodującej domenę helikazową ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 5' w wektorze pcDNA3.1. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych na wysokim poziomie [131].
- ❖ *pcDNA3.1-FLAG-Dicer-ΔPAZ* (#51367, Addgene) — konstrukcja genowa zawierająca fragment DNA genu *DICER1* pozbawiony sekwencji kodujących domeny: helikazową, DUF283, Platformy, PAZ i helisy łączącej ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 5' w wektorze pcDNA3.1. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych na wysokim poziomie [131].
- ❖ *pCAGGS-Flag-hsDicer (D1320A/D1709A)* (#41585, Addgene) — konstrukcja genowa zawierająca DNA genu *DICER1* z mutacją w obrębie domeny RNazy IIIa i IIIb (D1320A/D1709A) ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 5' w wektorze pcDNA3.1. Konstrukcja umożliwiająca produkcję białka w komórkach ssaczych na wysokim poziomie [132].
- ❖ *pUC19* (#SD0051, Thermo Scientific™) — wektor do klonowania zawierający gen oporności na ampicylinę w bakteriach. Wektor wykorzystywany jako substrat dsDNA.

Wszystkie zastosowane wektory oraz konstrukcje genowe pochodziły z kolekcji Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein IChB PAN w Poznaniu.

3.5 Startery

Startery wykorzystane w reakcjach amplifikacji zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed S.A. w Warszawie i pochodziły z kolekcji Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein IChB PAN w Poznaniu. Wykaz stosowanych starterów wraz z sekwencjami przedstawiono w Tabeli 3.1 i Tabeli 3.2.

Tabela 3.1 Wykaz starterów służących do amplifikacji określonych fragmentów DNA w reakcjach PCR. Podkreśleniem zaznaczono sekwencje umożliwiające wprowadzenie insertu do wektora SureVector. Pogrubieniem zaznaczono sekwencje nakładające dla reakcji OE-PCR.

Zastosowanie	Nazwa startera	Sekwencja 5'— 3'	T _m
Amplifikacja sekwencji DNA <i>DICER1</i> wraz z sekwencjami umożliwiającymi wprowadzenie insertu do wektora SureVector	hDcr_F	5'- <u>CCTTGTTTAAACTTTAAGAGGAGGGCCACCATG</u> AAAAGCCCTGCTTTGCA -3'	68,8 °C
	hDcr_R	5'- <u>ACTTCCACCGCCTCCAGAACCTCCGCCACCGCT</u> ATTGGGAACCTGAGG -3'	74 °C
Amplifikacja sekwencji DNA <i>DICER1</i> z delecją domeny PAZ	ΔPAZ-F	5'-TGACTCCAGCACTTTGATTCCAGCATCACTGT GGAGAAAA -3'	66,2 °C
	ΔPAZ-R	5'- CAGTGATGCTGGAATCAAAGTGCTGGAGT CATTAAACA -3'	63,6 °C
Amplifikacja sekwencji Dicer 1e w wektorze SureVector	SV1e_for	5'- ATCACTTCCTGCGGATTTTAGCTGAAAATG ATAATTACTGTAAG -3'	63,6 °C
	SV1e_rev	5'- CTGACTCCCACGCCAGCATGGTGGCCCTCC TCTTAAAGTTTAAAC -3'	71,8 °C
Reakcja <i>Overlap Extension PCR</i> dla zsyntetyzowanego fragmentu DNA do klonowania	for_ov	5'- GCC TCG AGA TTG ATC TAC CAT G -3'	54,8 °C
	rev_ov	5'- AAG CAA TTG TGC TGT GCT TAC AG -3'	53,5 °C
Identyfikacja sekwencji DNA <i>DICER1</i> w wektorze	qRNAb_F	5'- GCC TCC TAC CAC TAC AAT AC-3'	51,8 °C
	qRNAb_R	5'- ATG TAA ATG GCA CCA GCA AGC -3'	52,4 °C

Tabela 3.2 Wykaz starterów służących do amplifikacji określonych fragmentów cDNA w reakcjach qPCR.

Zastosowanie	Nazwa startera	Sekwencja 5'— 3'	T _m
Reakcja qPCR dla miRNA	Fr_mir21 aa	5'- GCTTATCAGACTGATGTTGAAA -3'	49,2 °C
	Fr_mir16-1 aa	5'- GCACGTAAATATTGGCGAA -3'	46,8 °C
	Fr_mir92a aa	5'- TTCCAATTGTCCCGGCCTGTAA -3'	56,7 °C
Reakcja qPCR dla mRNA	1e_F_qPCR	5'- CCTGCGGATTTTAGCTGAA -3'	48,9 °C
	1e_R_qPCR	5'- ATC TGC TGA AAC TTC AAC G -3'	48,5 °C
	FL_F_qPCR	5'- CGG ATT TTA GAT ACC CTA ACT -3'	48,5 °C
	FL_R_qPCR	5'- TCA CAG ACA TTT GGT CAT G -3'	46,8 °C
	fACT_qPCR	5'- CGA CAT GGA GAA AAT CTG G -3'	48,9 °C
	rACT_qPCR	5'- ATA GCA CAG CCT GGA TAG -3'	48,0 °C

3.7 Enzymy oraz bufony reakcyjne

Enzymy oraz bufony do reakcji PCR:

Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent)

5x Herculase II reaction buffer (Agilent)

PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent)

10x PfuUltra II reaction buffer (Agilent)

GoTaq® G2 DNA Polymerase (1 U/ μ l) (Promega™)

5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega™)

Enzymy oraz bufony do reakcji trawienia restrykcyjnego:

FastDigest XhoI (Thermo Scientific)

FastDigest MunI (Thermo Scientific)

10x FastDigest Buffer (Thermo Scientific)

Enzymy oraz bufony do reakcji ligacji:

T4 DNA Ligase (3 U/ μ l) (Promega™)

10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer (Promega™)

Enzymy oraz bufony do reakcji znakowania końca 5' oligonukleotydów:

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ L) (Thermo Scientific)

10x reaction buffer A for T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Scientific)

γ (32 P)ATP 5000 Ci/mmol (Hartman Analytic GmbH)

3.8 Przeciwciała

Pierwszorzędowe:

Dicer Antibody (F-10): sc-136979 (Santa Cruz Biotechnology) — rozcieńczenie 1:300

Dicer (D38E7) Rabbit mAb (5362) (Cell Signaling Technology) — rozcieńczenie 1:300

β -Actin (D6A8) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) — rozcieńczenie 1:1100

Anti-Lamin B1 antibody Nuclear Envelope Marker (ab16048) (Abcam) — rozcieńczenie 1:800

DYKDDDDK Tag (D6W5B) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) — rozcieńczenie 1:800

Recombinant Anti-PARP1 antibody (ab191217) (Abcam) — rozcieńczenie 1:800

Drugorzędowe:

Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) — rozcieńczenie 1:5000

Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) — rozcieńczenie 1:5000

3.9 Zestawy reakcyjne

Zestawy do tworzenia konstrukcji genowych:

SureVector Core Kit (Agilent)

SureVector Mammalian C-terminal Expansion Kit (Agilent)

Zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR:

DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research)

Zestaw do oczyszczania kwasów nukleinowych z żelu agarozowego:

Syngen Gel Mini Kit (Syngen)

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA na małą skalę:

Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx)

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA na dużą skalę:

ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research)

Zestaw do oznaczania ilościowego białka z kwasem bis-cynchoninowym (BCA):

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

Zestaw do frakcjonowania lizatów komórkowych:

NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific)

Zestawy do izolacji mRNA:

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

RNase-Free DNase Set (QIAGEN)

Zestaw do odwrotnej transkrypcji miRNA:

Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit (Takara Bio USA, Inc.)

3.10 Standardy wielkości

GeneRuler 1kb DNA Ladder (0.5 µg/µl) (Thermo Scientific): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 pz.

Perfect Tricolor Protein Ladder (EURx): 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17, 11 kDa.

3.11 Bufory i roztwory

Bufor Prot-S100 do lizy komórek:

30 mM HEPES, pH 7,4

100 mM KCl

5 mM MgCl₂

10% Glicerol

0,5 mM DTT

0,2% Tergitol

1× inhibitor proteaz Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail

Bufor RIPA do lizy komórek:

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

1% NP-40

0,5% Dezoksyholan sodu

0,1% SDS

1mM DTT

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego białek w żelach poliakrylamidowych, w warunkach denaturujących 4x SB:

250 mM Tris-HCl, pH 6,8

20% β-merkaptoetanol

8% SDS

0,15% Błękit bromofenolowy

40% Glicerol

Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących 10x SDS-PAGE:

10 mM Tris

384 mM Glicyna

0,2% SDS

Bufor do elektrotransferu półsuchego białek na membranę PVDF:

48 mM Tris

39 mM Glicyna

10% Metanol

0,0375% SDS

Bufor do przemywania membrany 1x PBS:

1 tabletki PBS na 500 ml wody

Bufor do przemywania membrany 1x PBST:

1x PBS

0,05% Tween 20

Roztwór do blokowania membrany:

1x PBST

3% Odtłuszczone mleko w proszku

Bufor TBS:

50 mM Tris HCl

150 mM NaCl, pH 7,4

Bufor B do przechowywania preparatów białkowych:

50 mM NaCl

20 mM Tris, pH 7,5

40% Glicerol

0,25% Triton X-100

Bufor do reakcji cięcia RNA i DNA przez hDicer:

2,5 mM MgCl₂

50 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Bufor do badania oddziaływań RNA z białkiem:

50 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Bufor obciążający do nakładania prób na żel poliakrylamidowy LB I (ang. *loading buffer D*):

0,05% Błękit bromofenolowy

0,05% Ksylencyjanol

w 10 M wodnym roztworze mocznika

3.12 Żele poliakrylamidowe

Żele analityczne do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących:

15% akrylamid/N,N'-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1×TBE.
Katalizatory polimeryzacji: 1 ml 10% nadsiarczanu amonu, 40 µl TEMED na 100 ml żelu.

20% akrylamid/N,N'-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1×TBE.
Katalizatory polimeryzacji: 1 ml 10% nadsiarczanu amonu, 40 µl TEMED na 100 ml żelu.

Żel preparatywny do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących:

8% akrylamid/N,N'-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1×TBE.
Katalizatory polimeryzacji: 400 µl 10% nadsiarczanu amonu, 40 µl TEMED na 50 ml żelu.

Żel preparatywny do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych:

8% akrylamid/N,N'-bisakrylamid w stosunku 29:1, 5% glicerol w buforze 1×TBE.
Katalizatory polimeryzacji: 400 µl 10% nadsiarczanu amonu, 40 µl TEMED na 50 ml żelu.

Żel analityczny do badania oddziaływań białko-kwas nukleinowy w warunkach natywnych

5% akrylamid/N,N'-bisakrylamid w stosunku 29:1, 5% glicerol w buforze 1×TBE.
Katalizatory polimeryzacji: 400 µl 10% nadsiarczanu amonu, 40 µl TEMED na 50 ml żelu.

Żele do elektroforezy białek SDS-PAGE:

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

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

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

Katalizatory polimeryzacji: 0,1% nadsiarczanu amonu, 2,8 µl TEMED na 7 ml żelu.

3.13 Najważniejsze odczynniki i materiały:

3xFLAG Peptide (Sigma), Agaroza (Syngen), Agaroza o niskiej temperaturze topnienia (Biotools), Akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid, 29:1 (Serva), Alkohol etylowy 96% (Chempur), Alkohol izopropylowy (Chempur), Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck), Ampicylina (BioShop), ANTI-FLAG®M2 Affinity Gel (Merck), APS (BioShop), Bufor 10x TBE (Roth), Chlorek magnezu (BioShop), cComplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche), Coomasie Bradford Assay (Promega), DharmaFECT kb DNA Transfection Reagent (Dharmacon), dNTP mix (New England Biolabs), EDTA (BioShop), Glicerol (BioShop), Glicyna (BioShop), iTaq Universal SYBR® Green Supermix (BioRad), Klisze rentgenowskie RTG-B (Primax), Membrana PVDF 0.45 µm (Thermo Scientific), Metanol (Chempur), Mocznik (BioShop), Octan sodu (Serva), Pepton (BioShop), RNA drożdżowe (Ambion), RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Scientific), RNaza T1 (Ambion), Spin-X Centrifuge Tube Filter 0,45µm Cellulose Acetate (Costar), SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), TEMED (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (BioShop), Trizol Reagent (Thermo Scientific), Tween 20 (BioShop), Woda wolna od RNaz i DNaz (EURx).

4. Metody

4.1 Praca z kwasami nukleinowymi

4.1.1 Przygotowanie konstrukcji genowych z sekwencją kodującą hDicer pełnej długości oraz wariant pozbawiony domeny PAZ w systemie SureVector

Oferowany przez firmę Agilent system SureVector umożliwia stworzenie niestandardowych konstrukcji genowych poprzez wprowadzenie wybranego insertu do szkieletu wektora samodzielnie skonfigurowanego przez użytkownika. Dostępne w tym systemie moduły funkcjonalne zawierają sekwencje kodujące m.in.: markery selekcyjne, miejsca inicjacji replikacji, promotory transkrypcji oraz N- lub C-końcowe znaczniki do fuzji z sekwencją genu docelowego. Łączenie poszczególnych elementów składowych konstrukcji genowej jest możliwe dzięki obecności sekwencji komplementarnych na końcach 5' i 3' poszczególnych modułów wektora i insertu.

4.1.1.1 Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR

W celu amplifikacji fragmentów DNA, mających stanowić insert wprowadzany do wektora, przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) na matrycy plazmidowego DNA (wektor *cDNA hsDicer*) niosącego pełną sekwencję genu *DICER1*. Reakcję PCR prowadzono z zastosowaniem polimerazy PfuUltra II Fusion High-fidelity DNA Polymerase. Mieszaninę reakcyjną wzbogacono betainą, odpowiadającą za eliminację formowania się struktur II rzędowych DNA w rejonach bogatych w guaninę oraz cytozynę, a także zwiększającą wydajność ich amplifikacji [133]. Do amplifikacji *DICER1* zastosowano specyficzną parę starterów: hDcr_F i hDcr_R. Sekwencje użytych starterów przedstawiono w Tabeli 3.1. Zastosowane startery zawierały na końcu 5', oprócz sekwencji komplementarnych do amplifikowanego fragmentu, 30 nt sekwencje komplementarne do wybranych modułów wektorowych z systemu Sure Vector Cloning Kit.

W przypadku konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant hDicer pozbawiony domeny PAZ (Δ PAZ) w pierwszym etapie amplifikowano oddzielnie dwa fragmenty *DICER1* flankujące region kodujący domenę PAZ. Amplifikację DNA prowadzono z użyciem specyficznych par starterów (Tabela 3.1): hDcr_F i Δ PAZ-R dla pierwszego fragmentu DNA (Δ PAZ DNA I); hDcr_R i Δ PAZ-F dla drugiego fragmentu DNA (Δ PAZ DNA II). Do reakcji amplifikacji wykorzystano startery, które zaprojektowano w taki sposób, by oba produkty PCR posiadały część wspólną w postaci identycznej sekwencji 31 nt. W pierwszym

fragmencie sekwencja ta znajdowała się na końcu 3', podczas gdy w drugim fragmencie na końcu 5'. Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła: hDicer — 5831 pz, ΔPAZ DNA I — 2670 pz, ΔPAZ DNA II — 2640 pz.

Tabela 4.1 Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składnik reakcji	Stężenie końcowe	Objętość na 1 próbkę (μl)
Betaina	1M	5
<i>cDNA hsDicer</i>	20 ng	1
Bufor 10x PfuUltra II Fusion	1x	2,5
dNTP	0,2mM	2,5
Starter Forward	0,3 μM	0,75
Starter Reverse	0,3 μM	0,75
Polimeraza PfuUltra II Fusion	0,2 U/ μl	0,5
H ₂ O	-	11,5
	Razem	25

Tabela 4.2 Profil temperaturowy reakcji PCR.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	95	120
Denaturacja	95	20
Wiązanie starterów	56	20
Synteza	72	106 (40*)
Synteza końcowa	72	420
Liczba cykli	30	

(*) Gwiazdką oznaczono warunki czasowe zastosowane przy amplifikacji fragmentów ΔPAZ DNA I oraz ΔPAZ DNA II.

Otrzymane w ten sposób fragmenty DNA (ΔPAZ DNA I oraz ΔPAZ DNA II) wykorzystano jako matryce we wspólnej reakcji PCR z wydłużeniem nakładających się odcinków (OE-PCR, ang. *Overlap Extension PCR*). Reakcję amplifikacji prowadzono z użyciem starterów zawierających 30 nt sekwencje komplementarne do wybranych modułów wektorowych z systemu Sure Vector Cloning Kit (hDcr_F i hDcr_R). Celem zwiększenia wydajności reakcji OE-PCR produkty PCR stanowiące matrycę dodano w stosunku molekularnym 1:1. Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosiła 5313 pz.

Tabela 4.3 Skład mieszaniny reakcyjnej do OE-PCR.

Składnik reakcji	Stężenie końcowe	Objętość na 1 próbkę (μl)
Betaina	1M	5
ΔPAZ DNA I	40 ng	1
ΔPAZ DNA II	40 ng	1
Bufor 10x PfuUltra II Fusion	1x	2,5
dNTP	0,2mM	2,5
Starter Forward	0,3 μM	0,75
Starter Reverse	0,3 μM	0,75
Polimeraza PfuUltra II Fusion	0,2 U/ μl	0,5
H ₂ O	-	11,5
	Razem	25

Tabela 4.4 Profil temperaturowy reakcji OE-PCR.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	95	120
Denaturacja	95	20
Wiązanie starterów	58	20
Synteza	72	80
Synteza końcowa	72	420
Liczba cykli	30	

4.1.1.2 Rozdział produktów PCR w żelu agarozowym

Do 5 μl produktu reakcji PCR dodano 1 μl buforu obciążającego 6x Loading Buffer Blue. Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze 1x TBE z dodatkiem Gel View lub bromku etydyny przy napięciu 120 V, przez 25 minut. Jako marker długości zastosowano Perfect Plus 1kb DNA Ladder. Wizualizację DNA w żelu agarozowym dokonano w świetle UV z wykorzystaniem urządzenia Alliance Q9 Advanced (UVITEC).

4.1.1.3 Oczyszczanie produktu PCR na mikrokolumnkach

Oczyszczanie produktów reakcji PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu DNA Clean & Concentrator™ 5 zgodnie z procedurą załączoną przez producenta. Oczyszczony DNA wymywano ze złoża w kolumnie przy pomocy 25 μl ultraczystej wody. Otrzymany DNA poddano ocenie ilościowej i jakościowej poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 230, 260 i 280 nm przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.1.1.4 Wprowadzenie insertu do szkieletu wektora w systemie SureVector

Procedurę wprowadzenia insertu do szkieletu wektora przeprowadzono zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta do zestawu SureVector Core Kit i SureVector Mammalian C-terminal Expansion Kit. W celu otrzymania funkcjonalnego wektora reakcja łączenia obejmowała oprócz oczyszczonego insertu również 6 modułów: gen oporności na ampicylinę, miejsce inicjacji replikacji w bakteriach (pUC), sekwencję łączącą XP1, gen oporności na puromycynę, promotor CMV, C-końcowy znacznik 3x Flag Tag.

Tabela 4.5 Skład mieszaniny reakcyjnej do połączenia insertu z modułami wektora.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μl)
Bufor 10x SureVector	2
Marker selekcyjny w bakteriach —ampicylina	2
Miejsce inicjacji replikacji w bakteriach — pUC	2
Sekwencja łącząca XP1	2
Marker selekcyjny w komórkach ssaczych —puromycyna	2
Promotor CMV	2
C-końcowy znacznik 3x Flag Tag	2
Insert — produkt reakcji PCR	360 ng
dNTP	1
1x SureSolution	2
Enzyme mix	1
H ₂ O	do 20
Razem	20

Tabela 4.6 Profil temperaturowy reakcji łączenia insertu z modułami wektora.

Etap	Liczba cykli	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
1	1	95	60
2	8	98	30
		62	60
		68	60
		68	60
3	1	68	60
4	1	4	120

Po zakończeniu inkubacji do reakcji dodano 1 μl enzymu DpnI dołączonego do zestawu. Całość inkubowano 5 minut w temperaturze 37 °C. Następnie próbę umieszczono w lodzie i inkubowano kolejne 5 minut.

4.1.1.5 Transformacja bakterii *Escherichia coli* DH5 α metodą szoku cieplnego (ang. *heat shock*)

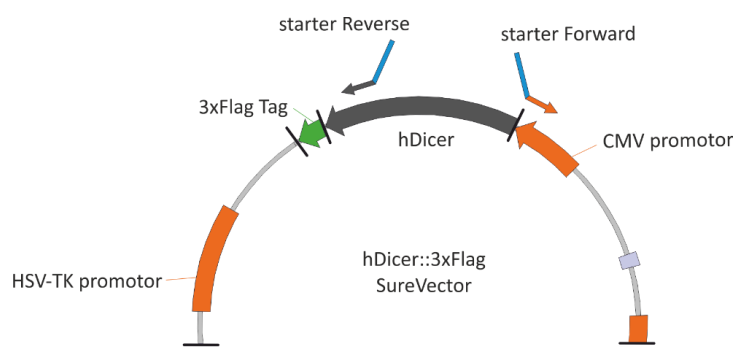
Do 50 μ l kompetentnych komórek *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α dodano 20 μ l mieszaniny ligacyjnej (lub 10 ng pDNA). Zawiesinę inkubowano przez 30 minut w lodzie, a następnie przez 30 sekund w 42 °C. Po przeprowadzonym szoku termicznym do bakterii dodano 1 ml sterylnej pożywki LB bez antybiotyku. Zawieszono w pożywce bakterie inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem przy 300 rpm. Następnie bakterie wysiano na szalki z podłożem stałym LB zawierającym antybiotyk selekcyjny (ampicylinę 100 μ g/ml). Szalki inkubowano przez noc w temperaturze 37 °C.

4.1.2 Przygotowanie konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e

Do przygotowania konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e wykorzystano otrzymaną uprzednio konstrukcję genową *hDicer::3xFlag*.

4.1.2.1 Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR

W celu amplifikacji pożądanego fragmentu DNA przeprowadzono reakcję PCR na matrycy pDNA *hDicer::3xFlag*. Reakcja amplifikacji polegała na powieleniu sekwencji wariantu Dicer1e oraz sekwencji wektora SureVector. Reakcję PCR prowadzono z zastosowaniem polimerazy Herculase II Fusion Polymerase. Mieszaninę reakcyjną wzbogacono DMSO, odpowiadającym za eliminację formowania się struktur II rzędowych DNA oraz zwiększającym wydajność amplifikacji. Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 3.1. Sekwencja kodująca Dicer1e posiada unikatową sekwencję początkową o długości 38 pz w porównaniu do sekwencji *hDicer* pełnej długości. Zastosowane startery w reakcji PCR zaprojektowano w taki sposób, żeby oprócz sekwencji komplementarnych do sekwencji *hDicer* i promotora CMV w wektorze, zawierały fragment sekwencji początkowej Dicer1e o długości 19 nukleotydów. Sekwencje te znajdowały się na końcu 5' obu starterów. Schemat reakcji amplifikacji sekwencji DNA wariantu Dicer1e przedstawiono na Rysunku 6. Wielkość amplifikowanego fragmentu — 8069 pz.



Rysunek 6. Schemat amplifikacji sekwencji Dicer1e w wektorze SureVector. Na rysunku przedstawiono miejsce komplementarnego wiązania się użytych starterów do sekwencji hDicer oraz promotora CMV w wektorze. Starter Reverse zaznaczony kolorem szarym hybrydyzował komplementarnie do sekwencji hDicer, starter Forward zaznaczony kolorem pomarańczowym hybrydyzował komplementarnie do sekwencji promotora CMV. Kolorem niebieskim zaznaczono fragmenty sekwencji początkowej Dicer1e znajdujące się na końcach 5' starterów, które nie hybrydyzowały komplementarnie do matrycy.

Tabela 4.7 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji sekwencji kodującej Dicer1e.

Składnik reakcji	Stężenie końcowe	Objętość na 1 próbkę (μl)
DMSO	1%	0,25
<i>hDicer::3xFlag</i>	20 ng	1
Bufor 5x Herculase II	1x	5
dNTP	0,2mM	2,5
Starter Forward	0,3 μM	2,5
Starter Reverse	0,3 μM	2,5
Polimeraza Herculase II Fusion DNA	0,2 U/ μl	0,5
H ₂ O	-	14,2
	Razem	25

Tabela 4.8 Profil temperaturowy reakcji PCR do amplifikacji sekwencji kodującej Dicer1e.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	95	120
Denaturacja	95	20
Wiązanie starterów	58	20
Synteza	72	270
Synteza końcowa	72	600
Liczba cykli	30	

Prawidłowość reakcji amplifikacji potwierdzono przeprowadzając rozdział produktu PCR w żelu agarozowym (rozdział Metody 4.1.1.2). Produkt reakcji PCR oczyszczono na mikrokolumnkach (rozdział Metody 4.1.1.3).

4.1.2.2 Fosforylacja końców 5'-OH produktu reakcji PCR

Oczyszczony produkt reakcji PCR poddano procedurze fosforylacji końców 5'. Do reakcji fosforylacji użyto 2 pmol DNA (liczonych jako wolne końce 5'). Do obliczenia pmoli DNA zastosowano dostępne online narzędzie Biomath Calculator (Promega). Reakcję fosforylacji prowadzono w temperaturze 37 °C przez 25 minut, a następnie przeprowadzono dezaktywację termiczną enzymu poprzez inkubację w temperaturze 75 °C przez 10 minut.

Tabela 4.9 Skład mieszaniny reakcyjnej do fosforylacji końców 5'-OH produktu reakcji PCR.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μl)
Bufor A 10x	2,5
Produkt reakcji PCR	2 pmol
10 mM ATP	2,5
Kinaza polinukleotydomowa T4 (PNK)	1
H ₂ O	5
Razem	25

Po fosforylacji DNA oczyszczono na mikrokolumnkach (rozdział Metody 4.1.1.3).

4.1.2.3 Ligacja produktu reakcji PCR zawierającego resztę fosforanową na końcach 5'

W celu połączenia końców uzyskanego produktu PCR i otrzymania funkcjonalnego plazmidu przeprowadzono reakcję ligacji z wykorzystaniem Ligazy T4 DNA. Do reakcji ligacji użyto 100 ng DNA zawierającego resztę fosforanową na końcach 5'. Reakcję prowadzono w temperaturze 15 °C przez 18 godzin, a następnie przeprowadzono dezaktywację termiczną enzymu w temperaturze 70 °C przez 10 minut.

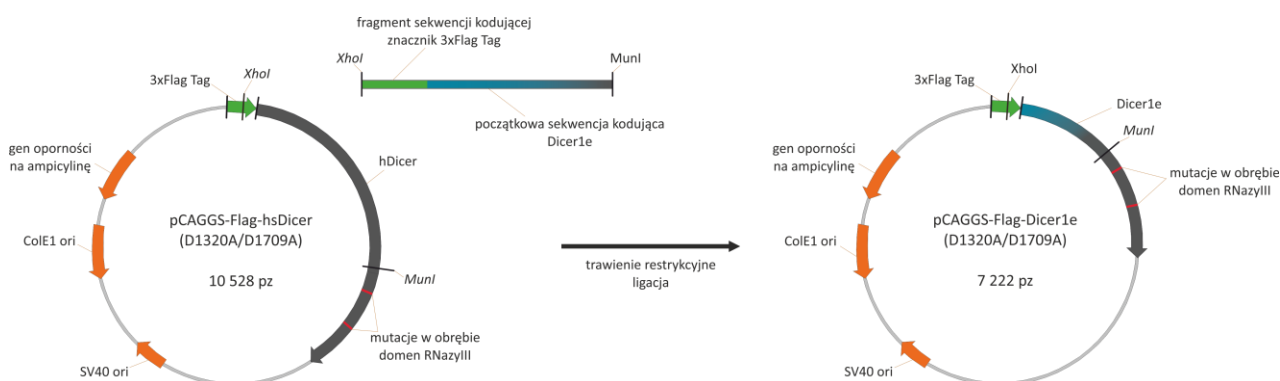
Tabela 4.10 Skład mieszaniny reakcji ligacji.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μl)
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	1
Produkt reakcji PCR-5'P	100 ng
T4 DNA Ligase	1
H ₂ O	do 10
Razem	10

Mieszaninę poligacyjną wykorzystano do transformacji komórek *E. coli* DH5 α metodą szoku cieplnego (rozdział 4.1.1.5).

4.1.3 Przygotowanie konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e z mutacją w domenach RNazy III

Do przygotowania konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e z mutacją w obu domenach RNazy III wykorzystano komercyjnie dostępną konstrukcję *pCAGGS-Flag-hsDicer* (D1320A/D1709A). Konstrukcja ta zawiera sekwencję hDicer z mutacją w obrębie domeny RNazy IIIa w pozycji D1320A oraz domeny RNazy IIIb w pozycji D1709A. Przy użyciu enzymów restrykcyjnych *XhoI* i *MunI* z wektora *pCAGGS-Flag-hsDicer* (D1320A/D1709A) wycięto sekwencję znacznika Flag Tag o długości 46 pz oraz fragment sekwencji *DICER1* o długości 4042 pz. Wycięty fragment w wektorze zastąpiono zsyntetyzowanym fragmentem DNA o długości 125 pz kodującym N końcową sekwencję wariantu Dicer 1e o długości 79 pz w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 5'. Schemat przygotowania konstrukcji genowej przedstawiono na Rysunku 7.



Rysunek 7. Schemat przygotowania konstrukcji genowej z sekwencją kodującą Dicer1e z mutacjami w domenach RNazy III. Na rysunku przedstawiono uproszczony schemat budowy wektora *pCAGGS-Flag-hsDicer* (D1320A/D1709A) oraz zsyntetyzowanego fragmentu DNA wraz z miejscami cięcia przez enzymy restrykcyjne *XhoI* i *MunI* (panel lewy). W wyniku trawienia restrykcyjnego oraz ligacji otrzymano konstrukcję genową *pCAGGS-Flag-hsDicer1e* (D1320A/D1709A) (panel prawy).

Fragment DNA zawierający N końcową sekwencję wariantu Dicer 1e o długości 79 pz w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu 5' został zsyntetyzowany w dwóch częściach (OVH_a i OVH_b), które następnie połączono ze sobą za pomocą reakcji OE-PCR. Reakcję OE-PCR prowadzono z zastosowaniem polimerazy Herculase II Fusion Polymerase. Sekwencje

starterów zastosowanych podczas reakcji OE-PCR przedstawiono w Tabeli 3.1. Wielkość amplifikowanego fragmentu — 125 pz.

Tabela 4.11 Skład mieszaniny reakcyjnej OE-PCR.

Składnik reakcji	Stężenie końcowe	Objętość na 1 próbkę (μl)
DMSO	1%	0,25
Oligonukleotyd OVH_a	500 ng	1
Oligonukleotyd OVH_b	500 ng	1
Bufor 5x Herculase II	1x	5
dNTP	0,2mM	2,5
Starter Forward	0,3 μM	2,5
Starter Reverse	0,3 μM	2,5
Polimeraza Herculase II Fusion DNA	0,2 U/ μl	0,5
H ₂ O	-	9,75
	Razem	25

Tabela 4.12 Profil temperaturowy reakcji OE-PCR.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	95	120
Denaturacja	95	20
Wiązanie starterów	50	20
Synteza	72	30
Synteza końcowa	72	600
Liczba cykli	30	

Prawidłowość reakcji amplifikacji potwierdzono przeprowadzając rozdział produktu PCR w żelu agarozowym (rozdział Metody 4.1.1.2). Produkt reakcji PCR oczyszczono na mikrokolumnkach (rozdział Metody 4.1.1.3).

4.1.3.1 Trawienie produktu reakcji OE-PCR oraz wektora *pCAGGS-Flag-hsDicer (D1320A/D1709A)* z udziałem enzymów restrykcyjnych

Oczyszczony produkt reakcji OE-PCR (insert) oraz wektor *pCAGGS-Flag-hsDicer (D1320A/D1709A)* poddano trawieniu za pomocą enzymów restrykcyjnych *XhoI* i *MunI*.

Tabela 4.13 Skład mieszaniny reakcyjnej tworzenia lepkich końców dla insertu i wektora.

Składnik reakcji	Insert	Wektor
DNA	300 ng	2000 ng
Enzym restrykcyjny <i>XhoI</i>	2 μ l	2 μ l
Enzym restrykcyjny <i>MunI</i>	2 μ l	2 μ l
10x FastDigest Buffer	3 μ l	3 μ l
H ₂ O	do objętości 30 μ l	do objętości 30 μ l
Razem	30 μ l	30 μ l

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Następnie enzymy inaktywowano termicznie w temperaturze 80 °C przez 5 minut. Po zakończeniu inkubacji, produkt reakcji OE-PCR oczyszczono na mikrokolumnkach (rozdział Metody 4.1.1.3), natomiast otrzymane fragmenty wektora poddano elektroforezie preparatywnej.

4.1.3.2 Izolacja i oczyszczanie wektora z żelu agarozowego

Elektroforezę preparatywną otrzymanych fragmentów wektora prowadzono w 0,7% żelu agarozowym w buforze 1x TBE z dodatkiem bromku etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 10 minut przy napięciu 50 V, a następnie przez 40 minut przy napięciu 90V.

Przy użyciu sterylnego skalpela wycięto fragment żelu zawierający fragment DNA wektora o pożądanej wielkości par zasad i umieszczono w 2 ml probówce typu eppendorf. Procedurę izolacji DNA z żelu prowadzono z wykorzystaniem zestawu Syngen Gel Mini Kit zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. Wyizolowane DNA zawieszono w wodzie, a następnie poddano ocenie ilościowej i jakościowej z użyciem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.1.3.3 Ligacja insertu do wektora

Przygotowane fragmenty DNA (insert oraz wektor) poddano procesowi ligacji w celu uzyskania zrekombinowanego plazmidu. Reakcję ligacji prowadzono z wykorzystaniem enzymu T4 DNA Ligase (3 U/ μ l) stosując stosunek molekularny wektora do insertu 1:3.

Tabela 4.14 Skład mieszaniny reakcji ligacji insertu i wektora.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μl)
Wektor	85 ng
Insert	4 ng
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	1
T4 DNA Ligase	1
H ₂ O	do 10
Razem	10 μl

Reakcję ligacji prowadzono w temperaturze 4 °C przez noc, a następnie przeprowadzono dezaktywację termiczną enzymu w temperaturze 70 °C przez 10 minut. Mieszaninę poligacyjną wykorzystano do transformacji komórek *E. coli* DH5α metodą szoku cieplnego (rozdział Metody 4.1.1.5).

4.1.4 Selekcja transformowanych kolonii bakteryjnych

Identyfikację kolonii bakteryjnych, zawierających zrekombinowany wektor przeprowadzono za pomocą metody kolonijnej reakcji PCR. Metoda ta umożliwia zidentyfikowanie kolonii bakteryjnych zawierających wprowadzony do wektora insert, bez konieczności izolacji pDNA i jego dalszego sekwencjonowania. Matryce do kolonijnej reakcji PCR stanowiły wyselekcjonowane po transformacji, pojedyncze kolonie bakteryjne zawieszono w 5 μl sterylnej wody. Zawiesinę bakterii inkubowano w temperaturze 98 °C przez 10 minut celem lizy komórek i uwolnienia DNA. Kolonijną reakcję PCR prowadzono z zastosowaniem polimerazy GoTaq G2 DNA Polymerase (1 U/μl) oraz pary starterów specyficznych dla sekwencji genu *DICER1*. Wykaz zastosowanych starterów przedstawiono w tabeli 3.1. Wielkość amplifikowanego fragmentu — 395 pz.

Tabela 4.15 Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy GoTaq G2 DNA Polymerase.

Składnik reakcji	Stężenie końcowe	Objętość na 1 próbkę (μl)
Zawiesina bakterii	-	5
Bufor GoTaq	1x	5
dNTP	0,2mM	2,5
Starter Forward	0,3 μM	1,25
Starter Reverse	0,3 μM	1,25
Polimeraza GoTaq G2	0,2 U/ μl	0,05
H ₂ O	-	9,95
Razem		25

Tabela 4.16 Profil temperaturowy kolonijnej reakcji PCR.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	95	180
Denaturacja	95	30
Wiązanie starterów	52	30
Synteza	72	30
Synteza końcowa	72	180
Liczba cykli	30	

Na podstawie przeprowadzonego rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym otrzymanych produktów reakcji PCR (rozdział 4.1.1.2) wybrano kolonie bakteryjne zawierające zrekombinowany wektor. Z wybranych kolonii bakteryjnych założono hodowle płynne w celu uzyskania materiału do izolacji plazmidowego DNA (pDNA). Wyizolowane pDNA poddano sekwencjonowaniu metodą Sangera przez firmę Genomed S.A w Warszawie.

4.1.5 Izolacja plazmidowego DNA

Izolację pDNA na małą skalę z bakterii przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Plasmid Miniprep DNA Purification Kit zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

Izolację pDNA na dużą skalę z bakterii przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

Wyizolowane plazmidowe DNA zawieszono w wodzie, a następnie poddano ocenie ilościowej i jakościowej z użyciem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.1.6 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych, w warunkach denaturujących

Elektroforezę cząsteczek kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących prowadzono w żelach poliakrylamidowych (PAA) zawierających 7 M mocznik. Stosowano 8% żełe preparatywne o wymiarach 19x18,5 cm oraz 15% lub 20% żełe analityczne o wymiarach 39x33 cm. Przed nałożeniem na żel, do analizowanych prób dodano roztwór 10 M mocznika w stosunku objętościowym 1:1. Następnie całość denaturowano w temperaturze 95 °C przez 3 minuty. Rozdział prób w żelu prowadzono w buforze 1x TBE, w następujących warunkach: dla mniejszych żeli — 450 V, 10 mA, 25 W, 30 minut, a następnie 450 V, 40 mA, 25 W, 1 godzina; dla dużych żeli — 1500 V, 10 mA, 50 W, 30 minut, a następnie 1500 V, 40 mA, 50 W, 2,5-3,5 godziny.

Rozdzielone w żelu, znakowane izotopem ^{32}P cząsteczki kwasów nukleinowych wizualizowano z użyciem kliszy rentgenowskich (żele preparatywne) lub przy użyciu skanerów: Fujifilm FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer i Amersham™ Typhoon™ (żele analityczne). Do analizy uzyskanych danych wykorzystano oprogramowanie Multi Gauge 3.0 (Fujifilm).

4.1.7 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych, w warunkach natywnych

Elektroforezę cząsteczek kwasów nukleinowych w warunkach natywnych prowadzono w 5% żelach PAA o wymiarach 19x18,5 cm. Przed nałożeniem na żel, do analizowanych prób dodano roztwór 50% glicerolu w stosunku objętościowym 1:1. Rozdział prób w żelu prowadzono w buforze 1x TBE, w następujących warunkach: 120V, 10mA, 25W przez 6 godzin. Rozdzielone w żelu, znakowane izotopem cząsteczki kwasów nukleinowych w kompleksie z białkiem wizualizowano przy użyciu skanerów: Fujifilm FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer i Amersham™ Typhoon™ (żele analityczne). Do analizy uzyskanych danych wykorzystano oprogramowanie Multi Gauge 3.0 (Fujifilm).

4.1.8 Znakowanie izotopem ^{32}P końca 5' oligonukleotydów RNA i DNA

Cząsteczki kwasów nukleinowych znakowano radioizotopowo przez fosforylację końca 5' $\gamma(^{32}\text{P})\text{ATP}$ przy udziale Kinazy Polinukleotydowej T4. Przed znakowaniem RNA lub DNA denaturowano poprzez inkubację w temperaturze 90 °C przez 3 minuty. Następnie mieszaninę umieszczono w lodzie.

Tabela 4.17 Skład mieszaniny reakcyjnej do znakowania izotopem ^{32}P końca 5' oligonukleotydu RNA lub DNA.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μl)
Cząsteczka RNA/DNA 10 μM	1
10x Bufor PNK A	1
Kinaza Polinukleotydowa T4	1
$\gamma(^{32}\text{P})\text{ATP}$	1
H ₂ O	6
Razem	10

Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37 °C przez 20 minut. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie do mieszaniny 10 μl 7 M mocznika i inkubację w 90 °C przez 3 minuty. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 8% żelu PAA w warunkach denaturujących.

4.1.9 Oczyszczanie kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych

Cząsteczki kwasów nukleinowych rozdzielano w żelu PAA zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody 4.1.6. Następnie przy użyciu sterylnej skalpela wycięto z żelu fragment zawierający cząsteczki RNA lub DNA o pożądanej długości. Wycięty fragment żelu rozdrobniono mechanicznie, zawieszono w 400 μ l 0,3 M octanu sodu, pH 5,0 i inkubowano z delikatnym wytrząsaniem w 4 °C przez noc. Następnie mieszaninę żelu i buforu naniesiono na kolumnkę Costar z filtrem Spin-X Centrifuge Tube Filter 0,45 μ m Cellulose Acetate i wirowano przez 5 minut, przy 13 000 rpm w celu pozbycia się fragmentów żelu. Do otrzymanego supernatantu dodano 900 μ l zimnego, 96% etanolu. RNA/DNA wytrącano w temperaturze -20 °C przez noc. Po zakończeniu inkubacji próby wirowano przez 45 minut, przy 13 000 rpm. Supernatant zebrano, a powstały osad przepłukano 200 μ l zimnego, 70% etanolu. Próby ponownie wirowano przez 30 minut, przy 13 000 rpm. Po usunięciu etanolu, osady osuszano przez inkubację w 37°C przez 10 minut, a następnie zawieszono w wodzie wolnej od RNaz i DNaz. Wyznakowane oligonukleotydy zostały rozcieńczone do stężenia 10 000 cpm/ μ l. Do pomiaru sygnału izotopowego wykorzystano licznik scyntylicyjny SPER.

4.1.10 Przygotowanie dwuniciowych cząsteczek RNA

W celu przygotowania dsRNA przeprowadzono hybrydyzację znakowanych izotopem ³²P cząsteczek RNA₃₂ z komplementarnymi, nieznakowanymi cząsteczkami RNA₃₂ ov lub RNA₃₂ bl w stosunku molowym 1:1. RNA zawieszono w 1x buforze do cięć i inkubowano w temperaturze 95 °C przez 3 minuty, a następnie powoli schładzano (-1°C/minutę) do temperatury 18 °C. Po hybrydyzacji RNA poddano elektroforezie w 8% natywnym żelu PAA (rozdział Metody 4.1.7). Następnie RNA wizualizowano z użyciem kliszy rentgenowskiej i oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody 4.1.9.

4.1.11 Cięcie cząsteczek RNA i DNA przez hDicer

Reakcje cięcia substratów RNA i DNA przez hDicer (oraz jej warianty delecyjne) przeprowadzono w buforze do cięć (rozdział Materiały 3.11). Mieszanina reakcyjna zawierała 200 ng pDNA lub ~5 nM znakowanego izotopem ³²P na końcu 5' oligonukleotydu oraz preparat białkowy o stężeniu w zakresie od 12,5 do 75 nM. Jako kontrole przygotowano reakcje bez białka oraz reakcje z dodatkiem EDTA w stężeniu 25 mM. Reakcje prowadzono w różnych punktach czasowych (zgodnie z opisem na rysunkach) w temperaturze 37 °C. W przypadku reakcji cięcia substratów RNA do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,25 μ l

inhibitora RNaz. Po zakończeniu inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodano 1 objętość buforu obciążającego LB I (rozdział Materiały 3.11). Produkty reakcji cięcia rozdzielano metodą elektroforezy w 15 lub 20% żelu PAA zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody 4.1.6.

4.1.12 Badanie oddziaływań białko-RNA metodą różnicowej migracji w żelach poliakrylamidowych (EMSA)

Znakowany izotopem ^{32}P na końcu 5' jedno- lub dwuniciowy RNA inkubowano z białkiem o stężeniu w zakresie od 12,5 do 100 nM w buforze do badania oddziaływań białko-RNA (rozdział Materiały 3.11). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w lodzie przez 10 minut. Po zakończeniu inkubacji, mieszaninę reakcyjną rozdzielano w 5% natywnym żelu PAA (rozdział Metody 4.1.7).

Tabela 4.18 Skład mieszaniny reakcyjnej do oddziaływań białko-RNA.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μl)
Cząsteczka ssRNA/dsRNA	1
Bufor	3
Białko	od 12,5 do 100 nM
H ₂ O	do 15 μl
Razem	15 μl

4.1.13 Izolacja całkowitego RNA z ludzkich linii komórkowych

Osad komórkowy zawieszono w 1 ml odczynnika Trizol i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 200 μl chloroformu. Całość wytrząsano na urządzeniu typu worteks przez 15 sekund i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbkę wirowano przez 15 minut przy 13 000 rpm w 4 °C w celu rozdzielenia mieszaniny na frakcję górną (wodną) zawierającą całkowite RNA i frakcję dolną (organiczną) zawierającą DNA i białka. Po wirowaniu ostrożnie przeniesiono fazę górną do nowej probówki typu eppendorf i dodano 500 μl izopropanolu. Całość inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w celu wytrącenia całkowitego RNA. Próbę wirowano przez 10 minut przy 13 000 rpm w 4 °C. Supernatant usunięto, a powstały osad RNA przepłukano dwukrotnie 1 ml 75% etanolu. Próbę wytrząsano przez 3 sekundy, a następnie wirowano przez 5 minut przy 7 500 rpm w 4 °C. Supernatant usunięto, a osad inkubowano przez 5 minut w 37

°C celem całkowitego odparowania etanolu. Osad całkowitego RNA zawieszono w 30 μ l wody wolnej od RNaz. Otrzymany całkowity RNA poddano ocenie ilościowej z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). RNA przechowywano w temperaturze -80 °C.

4.1.14 Izolacja mRNA z ludzkich linii komórkowych

Izolację mRNA z komórek przeprowadzono przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit, zgodnie z procedurą dołączoną przez producenta. Celem ograniczenia zanieczyszczenia prób genomowym DNA, dodatkowo podczas izolacji użyto zestawu RNase-Free DNase Set. Otrzymane mRNA poddano ocenie ilościowej z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), a następnie przechowywano w temperaturze -80 °C.

4.1.15 Odwrotna transkrypcja dla cząsteczek miRNA

W celu uzyskania cDNA niezbędnego do ilościowej analizy poziomu wybranych miRNA w komórkach wykorzystano zestaw Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit. Zawarty w zestawie mRQ Enzyme Mix umożliwia poliadenylację końcy 3' krótkich cząsteczek RNA poprzez działanie polimerazy poli(A), a następnie ich odwrotną transkrypcję z udziałem odwrotnej transkryptazy SMART® MMLV. Dzięki obecności adaptera dobudowywanego do końca 3' każdej z krótkich cząsteczek RNA podczas odwrotnej transkrypcji, możliwa jest analiza poziomu różnych miRNA z otrzymanej matrycy cDNA. Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 4 μ g całkowitego RNA zawierającego pulę krótkich cząsteczek RNA.

Tabela 4.19 Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji.

Składnik reakcji	Objętość na 1 reakcję (μ l)
mRQ Bufor 2x	5
RNA	4 μ g
mRQ Enzym	1,25
H ₂ O	do objętości 10
Razem	10 μ l

Reakcję prowadzono w temperaturze 37 °C przez 60 minut, a następnie w temperaturze 85 °C przez 5 minut. Po zakończeniu inkubacji próby umieszczono w lodzie i dodano 90 μ l wody wolnej od nukleaz. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20 °C.

4.1.16 Odwrotna transkrypcja dla cząsteczek mRNA

W celu uzyskania cDNA niezbędnego do ilościowej analizy ekspresji genu *DICER1* w komórkach wykorzystano zestaw SuperScript III Reverse Transcriptase, zgodnie z procedurą dołączoną przez producenta. Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 0,8 µg mRNA.

4.1.17 Analiza poziomu miRNA oraz ekspresji genu *DICER1* metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

W celu porównania poziomu wybranych miRNA w komórce oraz poziomu ekspresji genu *DICER1* wykorzystano metodę ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative real-time PCR*). Do analizy poziomu miRNA wykorzystano startery dołączone do zestawu Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit: parę starterów specyficzną dla sekwencji genu jąderkowego RNA U6 (U6 Forward primer oraz U6 Reverse primer) oraz uniwersalny starter 3' (mRQ 3'Primer). W przypadku analizy ekspresji genu *DICER1* zastosowano startery umożliwiające specyficzne rozróżnienie transkryptu hDicer pełnej długości oraz wariantu Dicer1e. Sekwencje zastosowanych starterów przedstawiono w Tabeli 3.2. Specyficzność wiązania starterów oceniono na podstawie analizy krzywych topnienia produktów reakcji. Reakcję qPCR prowadzono w aparacie CFX Connect™ Real-Time PCR Detection (Bio-Rad). Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej wykorzystano odczynnik iTaq Universal SYBR® Green Supermix. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem 8 ng matrycy cDNA.

Tabela 4.20 Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji qPCR.

Składnik reakcji	Stężenie końcowe	Objętość na 1 próbkę (µl)
Matryca cDNA	8 ng	2
iTaq Universal SYBR® Green Supermix	1x	5
Starter Forward	0,5 µM	0,35
Starter mRQ 3' Primer	0,5 µM	0,35
H ₂ O	-	2,3
	Razem	10 µl

Tabela 4.21 Profil temperaturowy reakcji qPCR.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)
Denaturacja wstępna	95	600
Denaturacja	95	15
Wiązanie starterów	60	30
Synteza	72	30
Liczba cykli	40	

Każda reakcja została przeprowadzona w trzech powtórzeniach technicznych, w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych. Względny poziom ekspresji genu *DICER1* wyznaczono przy użyciu metody $2^{-\Delta Ct}$. Analizę relatywnego poziomu wybranych miRNA mierzono z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [134]. Normalizację wyników przeprowadzono w oparciu o poziom ekspresji genu jądrowego RNA U6 lub β -aktyny, których poziom jest stały i niezależny od warunków eksperymentów. Analizę otrzymanych danych przeprowadzono wykorzystując oprogramowanie CFX Maestro 2.0 firmy BioRad. Zebrane dane z trzech, niezależnych powtórzeń biologicznych wykorzystano do analizy statystycznej jednokierunkowym testem ANNOVA, z testem wielokrotnych porównań Dunnetta. Analiza statystyczna została przeprowadzona w programie GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

4.2 Praca z komórkami ssaczymi

4.2.1 Hodowla komórek ssaczych

Hodowlę adherentnych komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice prowadzono w medium hodowlanym DMEM wzbogaconym: inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS), antybiotykami oraz pirogronianem sodu [67]. Hodowlę prowadzono w sterylnych butelkach hodowlanych w inkubatorze z 5% CO₂ i temperaturą 37 °C. Komórki utrzymywano w logarytmicznej fazie wzrostu poprzez regularne pasażowanie do nowych butelek hodowlanych po osiągnięciu przez hodowlę 80-90% konfluencji.

4.2.2 Pasażowanie komórek

Po usunięciu medium hodowlanego, warstwę komórek przepłukano buforem PBS w objętości odpowiedniej do naczynia hodowlanego. Po zebraniu buforu PBS do komórek dodano 0,25% roztwór trypsyny z EDTA w ilości odpowiedniej dla powierzchni naczynia hodowlanego. Następnie komórki inkubowano z trypsyną przez 3 minuty w atmosferze z 5% CO₂. Proces trypsynizacji zatrzymano poprzez dodanie 2 ml wzbogaconej pożywki DMEM. Po dokładnym

wymieszaniu, zawiesinę komórek przeniesiono do nowej butelki hodowlanej zawierającej kompletne medium hodowlane.

4.2.3 Transfekcja komórek i przygotowanie osadów komórkowych

Komórki HEK293T lub HEK293T No_Dice wysiano do butelki hodowlanej T25 w ilości odpowiednio 1×10^6 lub $1,5 \times 10^6$ komórek/butelkę w medium hodowlanym i hodowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37 °C. Wysiewanie takiej liczby komórek pozwalało na uzyskanie konfluencji komórek osiagającej ~80% powierzchni butelki po 24 godzinach. Do transfekcji przygotowano mieszaninę transfekcyjną w objętości 600 µl zawierającą 7 µg pDNA niosącego sekwencję kodującą odpowiednie białko i 18 µl odczynnika DharmaFECT kb DNA Transfection Reagent w pożywce OPTI-MEM. Mieszaninę inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dodano 2,4 ml pożywki DMEM. Dodatkowo przygotowano kontrolną mieszaninę transfekcyjną bez pDNA. Komórki inkubowano z mieszaniną transfekcyjną przez 24 godziny w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Po 24 godzinach medium zebrano, a komórki przepłukano buforem PBS i dodano 0,25% roztwór trypsyny z EDTA w ilości odpowiedniej dla powierzchni butelki hodowlanej T25. Komórki inkubowano z trypsyną przez 2 minuty w inkubatorze hodowlanym. Po zakończeniu procesu trypsynizacji zawiesinę komórek dokładnie wymieszano i przeniesiono do nowej butelki hodowlanej o większej powierzchni wzrostu (T75 lub T125). Komórki hodowano dalej w 37 °C w atmosferze 5% CO₂ przez kolejne 24 lub 48 godzin. Po tym czasie medium usunieto, a komórki przepłukano buforem PBS i poddawano procesowi trypsynizacji. Uzyskaną zawiesinę komórek wirowano przez 3 minuty przy 1500 rpm. Otrzymany osad komórkowy przemyto buforem PBS i ponownie wirowano przez 3 minuty przy 1500 rpm. Bufor PBS usunięto, a osad komórkowy przechowywano w temperaturze -80 °C.

4.2.4 Przygotowanie lizatów komórkowych

W celu otrzymania frakcji białek cytoplazmatycznych osad komórkowy (~ 8×10^6 komórek) zawieszono w 200 µl buforu Prot-S100 (rozdział Materiały 3.11), a następnie zawiesinę komórek przepuszczano przez strzykawkę z jednorazową igłą iniekcyjną o wymiarach 0,9x40 mm. Otrzymany lizat komórkowy wirowano przez 10 minut w temperaturze 4 °C przy 13 000 rpm. Zebrany supernatant stanowiący frakcje białek cytoplazmatycznych stanowił materiał do immunoprecypitacji białek.

W celu otrzymania frakcji białek cytoplazmatycznych i jądrowych osad komórkowy ($\sim 8 \times 10^6$ komórek) zawieszono w 200 μl buforu RIPA (rozdział Materiały 3.11). Zawiesinę inkubowano w lodzie przez 20 minut co pewien czas intensywnie mieszając próbkę na wytrząsarce typu worteks. Następnie otrzymany lizat komórkowy wirowano przez 10 minut w temperaturze 4 °C przy 13 000 rpm. Zebrany supernatant stanowiący frakcje białek cytoplazmatycznych i jądrowych stanowił materiał do analiz Western blotting.

4.2.5 Izolacja frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej z komórek HEK293T

Procedurę frakcjonowania kompartmentów komórkowych na materiał pochodzący z cytoplazmy oraz jądra komórkowego przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents. Z hodowli komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice pobrano 3×10^6 komórek przeliczonych za pomocą automatycznego licznika komórek Scepter™ (Merck). Komórki zebrano poprzez wirowanie przez 3 minuty, przy 1500 rpm. Po usunięciu medium hodowlanego osad komórkowy przepłukano 1 ml buforu PBS, a następnie zwirowano przez 3 minuty, przy 1500 rpm. Supernatant zebrano, a osad komórkowy zawieszono w 300 μl zimnego buforu CER I. Próbkę wytrząsano przez 15 sekund przy wykorzystaniu urządzenia typu worteks i inkubowano w lodzie przez 10 minut. Następnie dodano do próbki 16,5 μl buforu CER II, wytrząsano przez 5 sekund i inkubowano w lodzie przez 1 minutę. Po inkubacji próbę wirowano przez 5 minut przy 16 000 rpm. Supernatant (frakcję białek cytoplazmatycznych) przeniesiono do nowej próbówki. Pozostały osad komórkowy zawieszono w 150 μl buforu NER i inkubowano w lodzie przez 40 minut. W trakcie inkubacji próbę wytrząsano przez 15 sekund co 10 minut. Kolejno, próbę wirowano przez 10 min przy 16 000 rpm. Otrzymany supernatant (frakcję białek jądrowych) przeniesiono do nowej próbówki. Otrzymane frakcje przechowywano w temperaturze -20 °C.

Pomiar stężenia białek w uzyskanych frakcjach lizatów komórkowych przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Pierce BCA Protein Assay Kit zgodnie z procedurą dołączoną przez producenta.

4.2.6 Indukcja procesu apoptozy w komórkach

Komórki HEK293T lub HeLa wysiano do butelki hodowlanej T25 w liczbie 1×10^6 komórek/butelkę w medium hodowlanym i hodowano przez 24 godziny w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37 °C. Następnie medium hodowlane zastąpiono świeżym medium z dodatkiem

staurosporyny w stężeniu 1 μM . Komórki HeLa oraz HEK293T inkubowano ze staurosporyną przez określony czas od 1 do 4 godzin w atmosferze 5% CO_2 i temperaturze 37 °C. Po określonym czasie medium hodowlane z odklejonymi komórkami zebrano do probówki, a pozostałe komórki poddano procesowi trypsynizacji poprzez dodanie 0,25% roztworu trypsyny z EDTA w ilości odpowiedniej dla powierzchni butelki hodowlanej T25. Całość wirowano przez 3 minuty przy 1500 rpm. Otrzymany osad komórkowy przemyto buforem PBS i ponownie wirowano przez 3 minuty przy 1500 rpm. Bufor PBS usunięto, a zebrany osad komórkowy poddano lizie w buforze RIPA (rozdział Metody 4.2.4).

4.3 Praca z białkami

4.3.1 Immunoprecypitacja białek

Immunoprecypitację białek prowadzono z wykorzystaniem złoża agarozowego opłaszczonego przeciwciałem anti-Flag Tag, ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel. Kolumnkę chromatograficzną zawierającą 600 μl złoża przemywano kolejno: jednokrotnie 600 μl buforu TBS; trzykrotnie 600 μl roztworu 0,1 M Glicyny-HCl pH 3,5; pięciokrotnie 600 μl buforu TBS, każdorazowo wirując kolumnkę umieszczoną w 2 ml eppendorfie przez 1 min, przy 800 rpm. Po płukaniu, złożo przeniesiono do 5 ml probówki i dodano supernatant zawierający frakcję białek cytoplazmatycznych. Złożo z supernatantem inkubowano przez noc w 4 °C na mieszadle obrotowym, a następnie umieszczono w kolumnie chromatograficznej o objętości 1,5 ml. Złożo agarozowe ze związanym białkiem płukano buforem TBS do momentu, gdy wartość absorbancji przy długości fali 280 nm dla przesączu wynosiła poniżej 0,05. Następnie złożo agarozowe zawieszono w 3 ml buforu B do przechowywania preparatów białkowych bez glicerolu (rozdział Materiały 3.11) i przeniesiono do nowej 5 ml probówki. W celu wymycia ze złoża związanego białka, do złoża dodano 75 μl peptydu 3x Flag o stężeniu 4 mg/ml. Mieszaninę inkubowano przez noc w 4 °C na mieszadle obrotowym. Po inkubacji mieszaninę umieszczono w kolumnie chromatograficznej znajdującej się w 2 ml eppendorfie i wirowano przez 1 min, przy 800 rpm. Zebrany przesącz zagęszczono z wykorzystaniem filtrów Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filters o punkcie odcięcia MWCO 30 lub 100 kDa. Procedurę zagęszczania preparatu przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Otrzymany w ten sposób zagęszczony preparat białkowy poddano analizie metodą elektroforezy białek w żelu PAA, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).

4.3.2 Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących prowadzono w żelach PAA (8% lub 10% żel rozdzielający i 5% żel zagęszczający) (rozdział Materiały 3.12). Materiał do analiz stanowiły preparaty białek oczyszczonych metodą immunoprecypitacji lub całkowite i frakcjonowane lizaty komórkowe. Do 15 µl badanej próby dodano 5 µl 4x stężonego buforu obciążającego SB (rozdział Materiały 3.11) i denaturowano w 95 °C przez 3 minuty. Całość mieszaniny nałożono na uprzednio przygotowany żel PAA. Jako wzorca mas użyto Perfect Tricolor Protein Ladder. Początkowo rozdział prowadzono przy napięciu 50 V do momentu wejścia prób w żel rozdzielający. Następnie napięcie prądu zwiększono do 150 V. Rozdział prób w żelu prowadzono do momentu wyjścia z żelu barwika — błękitu bromofenolowego (składnik buforu SB). W celu wizualizacji białek, po zakończeniu elektroforezy żel PAA wygotowano trzykrotnie w wodzie destylowanej w celu pozbycia się SDS. Następnie żel barwiono w roztworze PageBlue™ Protein Staining Solution zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Żele dokumentowano i analizowano za pomocą aparatu Alliance Q9 Advanced (UVITEC).

4.3.3 Półsuchy elektrotransfer białek na membranę PVDF

W przypadku analizy białek metodą Western blotting, po zakończonym rozdziale elektroforetycznym przeprowadzono transfer półsuchy białek z żelu PAA na membranę PVDF. W tym celu przygotowano dwie bibuły do transferu i membranę PVDF o wymiarach żelu po usunięciu żelu zagęszczającego. Membranę PVDF aktywowano poprzez przepłukanie w 100% metanolu, a bibuły umieszczono w buforze do elektrotransferu. Poszczególne elementy ułożono w aparacie do elektrotransferu Trans-blot SD Semi-Dry transfer cel (BioRad) (przy zachowaniu odpowiedniej orientacji względem elektrod) w następującej kolejności: bibuła, membrana PVDF, żel, bibuła. Elektrotransfer prowadzono przy napięciu 25 V i natężeniu 100 mA przez 95 minut. Po zakończeniu elektrotransferu membranę umieszczono w roztworze do blokowania (rozdział materiały 3.11) i inkubowano przez noc w 4 °C.

4.3.4 Detekcja białek immobilizowanych na membranie PVDF

Detekcję białek immobilizowanych na membranie PVDF przeprowadzono z użyciem systemu SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System (Merck). Zablockowaną membranę PVDF

z immobilizowanymi białkami przepłukano dwukrotnie buforem PBST, a następnie dwukrotnie buforem PBS (rozdział Materiały 3.11). Kolejno na membranę dodano odpowiednie rozcieńczenie przeciwciał pierwszorzędowych (rozdział Materiały 3.8) w buforze PBST. Inkubację membrany z przeciwciałem prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym membranę ponownie przepłukano dwukrotnie buforem PBST i PBS. Następnie na membranę dodano odpowiednie rozcieńczenie odpowiednich, gatunkowo specyficznych, przeciwciał drugorzędowych IgG sprzężonych z peroksydazą chrzanową (HRP) (rozdział Materiały 3.8) w buforze PBST. Inkubację membrany z przeciwciałem prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym membranę ponownie przepłukano dwukrotnie buforem PBST i trzykrotnie buforem PBS. Detekcję kompleksów białko-przeciwciała przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate oraz aparatu Alliance Q9 Advanced (UVITEC).

4.4 Sekwencjonowanie RNA

Sekwencjonowaniu poddano pulę RNA wyizolowanego z komórek HEK293T i HEK293T No_Dice: (i) traktowanych odczynnikami do transfekcji (tzw. typu dzikiego, wt) oraz (ii) transfekowanych wektorem niosącym sekwencję kodującą wariant Dicer1e (*Dicer1e::3xFlag*). Osady komórkowe zostały zebrane po 48 godzinach od transfekcji lub od potraktowania odczynnikami do transfekcji (rozdział Metody 4.2.3). Następnie, z otrzymanych osadów komórkowych został wyizolowany całkowity RNA przy użyciu odczynnika TRIzol (rozdział 4.1.13). Usługę sekwencjonowania RNA-Seq całkowitej frakcji RNA wyizolowanego z komórek zlecono firmie BGI. Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono przy pomocy technologii MGI DNBSeg™. Technologia DNBSeg™ oparta jest na metodzie DNB (ang. *DNA Nanoballs*). Otrzymane podczas przygotowania biblioteki NGS kompleksy cDNA-nanokulki (DNB) są umieszczane na specjalnym chipie. W kolejnym etapie przeprowadza się hybrydyzację startera do adaptera w kompleksie DNB. Następnie rozpoczyna się reakcja PCR z wykorzystaniem wyznakowanych fluorescencyjnie dNTP oraz polimerazy DNA. Reakcja PCR przebiega według modelu toczącego się koła (ang. *rolling circle replication*), która zapewnia, iż każda kopia jest generowana z oryginalnego, matrycowego cDNA. Zastosowane lasery sekwenatora wzbudzają fluorescencję, a otrzymywane sygnały są przekształcane na sekwencję DNA.

Przygotowanie bibliotek cDNA oraz ich sekwencjonowanie wraz z obróbką uzyskanych danych zostało zlecone firmie BGI. Usunięcie z uzyskanych surowych danych odczytów

niskiej jakości oraz sekwencji adapterów, a także sprawdzenie jakości odczytów z wykorzystaniem współczynnika Q było przeprowadzone z wykorzystaniem standardowych programów i protokołów oferowanych przez firmę BGI. Otrzymane odczyty zostały przypisane (zmapowane) do ludzkiego genomu referencyjnego hg38 (UCSC *Homo_sapiens* hg38) przy pomocy programu HISAT [135]. Normalizacja poziomów ekspresji genów oraz analiza różnicowa ekspresji genów w komórkach zostały wykonane przy użyciu pakietu edgeR (v3.36.0) [136], przy współpracy z dr. Arkadiuszem Kajdaszem z Pracowni Bioinformatyki IChB PAN w Poznaniu. Do analizy porównawczej zostały wybrane geny, które miały zachowane co najmniej 10 odczytów w próbce. Różnica w poziomie ekspresji genów została przedstawiona graficznie w postaci map ciepła (ang. *heatmap*) wygenerowanych za pomocą pakietu mixOmics (v6.18.1) [137]. Analizy ontologii genów i wzbogacania zestawu genów różnicujących zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu GOfuncR (v1.14.0) [138].

5. Wyniki

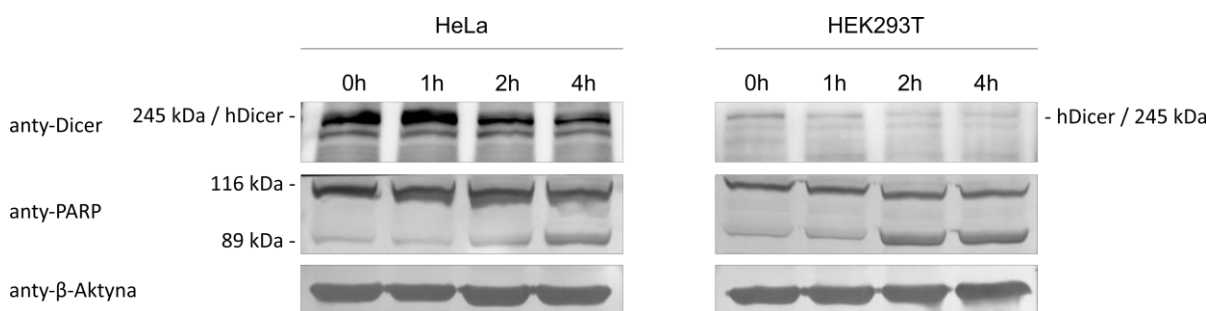
Długość produktów generowanych przez rybonukleazy typu Dicer determinowana jest odległością pomiędzy domeną kotwiczącą substrat a domenami przeprowadzającymi proces cięcia substratu, czyli domenami RNazy IIIa i RNazy IIIb [87, 88]. Kanoniczne substraty Dicer są rozpoznawane i kotwiczone przez domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej (tzw. kasetę PPC). W obrębie domeny PAZ występuje tzw. kieszeń wiążąca 3', która rozpoznaje i wiąże dwunukleotydowy niesparowany koniec 3' substratu (pre-miRNA lub pre-siRNA) [28, 58, 81, 82]. Natomiast grupa fosforanowa na końcu 5' substratu wiązana jest w tzw. kieszeni wiążącej 5' występującej w obrębie domeny Platformy i PAZ [83, 84]. Obecność wszystkich domen hDicer jest kluczowa dla wydajnego i precyzyjnego cięcia substratów pre-miRNA, a tym samym generowania miRNA o określonej długości [73]. Znane są jednakże warianty rybonukleaz Dicer pozbawione niektórych z domen, tzw. „skrócone formy” („skrócone warianty”) Dicer. Skrócone formy Dicer mogą powstawać, między innymi, w rezultacie procesu alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu kodującego Dicer [120, 122, 125], bądź w wyniku aktywności hydrolitycznej proteaz komórkowych [126, 128, 129]. Aktywności skróconych form Dicer różnią się od aktywności białek „pełnej długości”. Co ciekawe, wykazano, iż u nicienia *C. elegans* aktywowane podczas procesu apoptozy kaspazy przecinają Dicer, generując skróconą formę białka (tDCR-1), która pełni funkcję deoksyrybonukleazy (DNazy) inicjującej proces fragmentacji chromosomalnego DNA [128, 129]. Dane literaturowe nie zawierają jednak informacji na temat potencjalnej aktywności DNazowej hDicer. Biorąc pod uwagę powyższe kwestie, pierwszym celem przedłożonej rozprawy doktorskiej było zbadanie, czy hDicer, podobnie jak Dicer *C. elegans*, posiada potencjał do hydrolizy substratów DNA.

5.1 Badanie potencjalnej aktywności DNazowej hDicer

W celu sprawdzenia, czy hDicer, podobnie jak Dicer *C. elegans*, ulega proteolitycznemu cięciu przez kaspazy aktywowane podczas procesu apoptozy, wywoływano apoptozę w komórkach ludzkich. Dostępne dane literaturowe wskazują na występowanie w obrębie sekwencji aminokwasowej hDicer miejsc rozpoznawanych przez kaspazę 3/7. Miejsca te znajdują się pomiędzy domenami RNazy III, dokładniej, pomiędzy kwasem asparaginowym w pozycji 1644 a alaniną w pozycji 1645 [130]. Potencjalny produkt hydrolizy hDicer przez kaspazę 3/7 powinien wynosić ~185 kDa [130]. W badaniach wykorzystano komórki ludzkie linii HEK293T i HeLa. Jako czynnik uruchamiający szlak apoptotyczny zastosowano

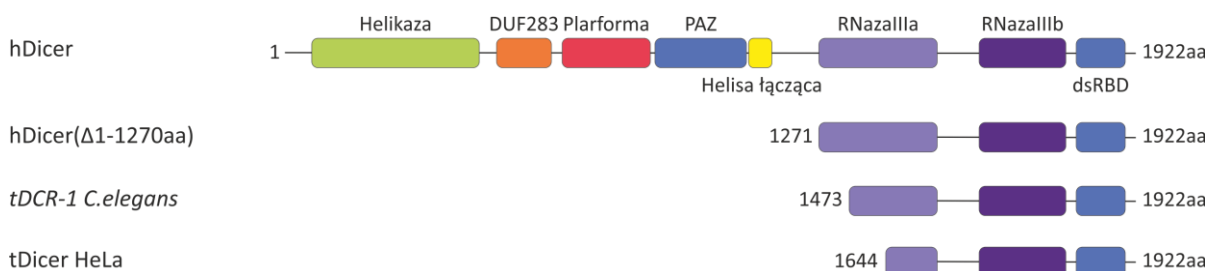
staurosporynę. Staurosporyna jest inhibitorem kinaz białkowych i dobrze znanym czynnikiem proapoptotycznym [139, 140]. Komórki HeLa oraz HEK293T inkubowano z roztworem staurosporyny (1 μ M) w medium hodowlanym (w objętości 3ml) przez okres: 0, 1, 2, 4 godzin. Po tym czasie komórki zebrano poprzez wirowanie, a otrzymany osad komórkowy poddano lizie w buforze RIPA celem uwolnienia frakcji białek cytoplazmatycznych i jądrowych (rozdział Metody 4.2.4). Otrzymane lizaty komórkowe poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w warunkach denaturujących w żelu PAA, a następnie przeprowadzono transfer półsuchy białek z żelu na membranę PVDF (rozdział Metody 4.3.2 i 4.3.3). Detekcję białka hDicer przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-Dicer (D38E7) (rozdział Materiały 3.8). Jako kontrolę aktywacji apoptozy zastosowano przeciwciało pierwszorzędowe anti-PARP (rozdział Materiały 3.8). PARP jest polimerazą poli(ADP-rybozy) o masie 116 kDa. Uwalniane podczas procesu apoptozy kaspazy przecinają białko PARP, generując produkt o masie 89 kDa [141]. Analizę Western blottingu lizatów komórkowych przedstawiono na Rysunku 8.

W wyniku indukcji procesu apoptozy, w testowanych liniach komórkowych: HeLa oraz HEK293T, obserwowano zanikanie pełnej formy hDicer (Rysunek 8), jednakże nie zaobserwowano pojawiania się skróconej formy hDicer o masie \sim 180-190 kDa, zgodnie z hipotetycznym miejscem cięcia dla kaspazy 3/7 uwalnianianej podczas procesu apoptozy [130]. Analiza Western blotting z przeciwciałami anti-PARP pozwoliła na zidentyfikowanie sygnału pochodzącego od produktu cięcia białka PARP o masie 89 kDa, co wskazuje, że w komórkach aktywowane były apoptotyczne kaspazy (Rysunek 8).



Rysunek 8. Detekcja białka hDicer w lizatach komórkowych pochodzących z komórek HeLa oraz HEK293T po indukcji procesu apoptozy. Detekcję białka przeprowadzono metodą Western blotting.

Wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein IChB PAN przez dr Marię Pokornowską wykazały, iż warianty hDicer otrzymane metodami inżynierii genetycznej (Rysunek 9), dokładniej: (i) wariant hDicer(Δ 1-1270aa), zawierający obie domeny RNazy III i dsRBD, (ii) wariant odpowiadający tDCR-1 *C. elegans* oraz (iii) wariant odpowiadający hipotetycznej C-końcowej formie hDicer powstającej w komórkach HeLa podczas apoptozy [130], nie hydrolizowały substratów DNA.



Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie architektury ludzkiej rybonukleazy Dicer oraz skróconych form: wariantu hDicer zawierającego domeny RNazy III oraz domenę dsRBD; wariantu odpowiadającego skróconej formie Dicer powstającej podczas apoptozy w komórkach nicienia *C. elegans* (tDCR-1) i komórkach HeLa (tDicer).

Niemniej jednak w celu zbadania, czy skrócone formy hDicer mogą prezentować aktywność DNazową, przeprowadzono testy aktywności z wykorzystaniem następujących wariantów delecyjnych hDicer: (i) wariantu pozbawionego domeny helikazowej (Δ Helikaza), (ii) wariantu pozbawionego domen helikazowej i DUF283 (Δ Helikaza-DUF283), dwóch wariantów pozbawionych domeny DUF283, z odpowiednio (iii) mniejszą Δ DUF(630-709aa) i (iv) większą Δ DUF(625-752aa) delecją w obrębie tej domeny, (v) wariantu pozbawionego domeny PAZ (Δ PAZ) oraz (vi) wariantu pozbawionego kasety PPC (Δ PPC). Warianty delecyjne hDicer: Δ PPC, Δ DUF(630-709aa) i Δ DUF(625-752aa) zostały otrzymane przez dr inż. Agnieszkę Szczepańską [100].

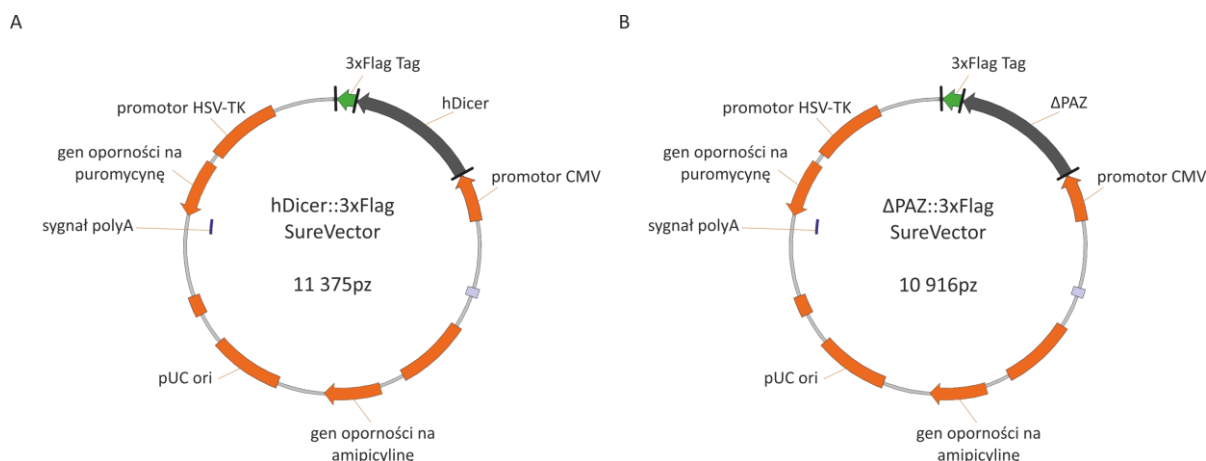
Do produkcji wariantów delecyjnych hDicer została wykorzystana linia komórkowa HEK293T No_Dice, posiadająca mutacje typu *knock out* we wszystkich kopiach genu *DICER1* [67]. W wyniku wprowadzonej mutacji komórki HEK293T No_Dice nie produkują endogennej hDicer. W przypadku wariantów, dla których nie została przeprowadzona analiza aktywności RNazowej, każdorazowo, przed rozpoczęciem badania aktywności DNazowej, przeprowadzono także reakcje cięcia z wykorzystaniem substratów: (i) pre-miRNA (pre-miRNA 16-1), (ii) jednoniciowego RNA o długości 21 nt (ssRNA21) oraz dwóch dupleksów

RNA o długości 30 pz: (iii) dupleksu posiadającego dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (dsRNA_ov) oraz (iv) dupleksu z tępo zakończonymi końcami (dsRNA_bl).

5.1.1 Aktywność nukleazowa wariantów Δ PAZ i Δ PPC

W początkowym etapie badań skupiono się na uzyskaniu wariantów hDicer pozbawionych domeny PAZ (wariant Δ PAZ) oraz domen Platformy, PAZ i helisy łączącej (wariant Δ PPC). W tym celu przygotowano konstrukcje genowe niosące sekwencje kodujące warianty delecyjne hDicer: (i) Δ PAZ — wariant z delecją domeny PAZ, obejmującą aminokwasy 891-1042, w tym aminokwasy tworzące kieszeń odpowiadającą za kotwiczenie końca 3' pre-miRNA oraz (ii) Δ PPC — wariant z delecją kasety PPC, obejmującą aminokwasy 753-1068. Jako kontrolę przygotowano konstrukcję genową zawierającą sekwencję hDicer pełnej długości, tak zwaną sekwencję typu dzikiego (wt hDicer). Do sekwencji kodującej dany wariant hDicer każdorazowo dołączona została sekwencja kodująca znacznik 3x Flag Tag. Dzięki znacznikowi 3x Flag Tag produkowane w komórkach białko mogło zostać oczyszczone metodą immunoprecypitacji.

Sekwencję DNA kodującą wt hDicer, jak i wariant pozbawiony domeny PAZ, uzyskano metodą PCR przeprowadzając reakcję amplifikacji na matrycy pDNA *cDNA hsDicer* niosącego sekwencję cDNA wariantu 2 transkryptu genu *DICER1* (NM_030621). Szczegółowy opis przygotowania konstrukcji genowych opisano w rozdziale Metody 4.1.1. Otrzymane produkty reakcji PCR wprowadzono do wektora ekspresyjnego SureVector, pomiędzy sekwencję kodującą promotor CMV oraz sekwencję kodującą znacznik 3x Flag Tag. W konsekwencji otrzymano dwa wektory ekspresyjne: (i) wektor kodujący białko typu dzikiego (*hDicer::3xFlag*) oraz (ii) wektor kodujący wariant Δ PAZ (*hDicer_ΔPAZ::3xFlag*), w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu C, pod kontrolą promotora CMV (Rysunek 10).

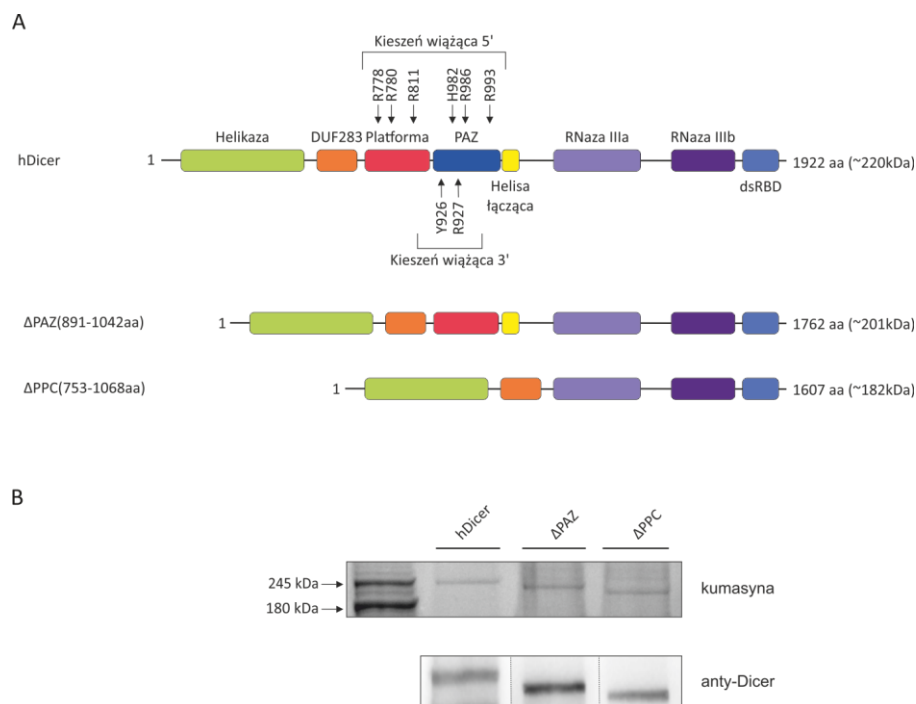


Rysunek 10. Uproszczony schemat budowy wektora SureVector wraz z wprowadzoną sekwencją kodującą: wt hDicer (A) oraz wariant Δ PAZ (B) w fuzji ze znacznikiem 3xFlag Tag.

Przygotowanymi wektorami transformowano bakterie *E. coli*. Obecność zrekombinowanego wektora (zawierającego pożądaną wstawkę) w komórkach bakteryjnych potwierdzono z wykorzystaniem kolonijnej reakcji PCR (rozdział Metody 4.1.4), z użyciem starterów specyficznych dla sekwencji *DICER1* (rozdział Materiały 3.5). Z wybranych, na podstawie kolonijnej reakcji PCR, pozytywnych klonów bakteryjnych wyizolowano pDNA. Otrzymany pDNA został wykorzystany jako matryca w reakcji sekwencjonowania metodą Sangera, w celu sprawdzenia zgodności sekwencji insertu z sekwencją referencyjną, a także poprawności zachowania ramki odczytu względem kodonu start oraz sekwencji kodującej znacznik 3x Flag Tag.

Wektory: (i) *hDicer::3xFlag*, (ii) *hDicer_ΔPAZ::3xFlag*, lub (iii) *hDicer_ΔPPC::3xFlag*, użyto do otrzymania preparatów białkowych z wykorzystaniem ssaczego układu ekspresyjnego. W tym celu przeprowadzono transfekcje komórek HEK293T No_Dice przygotowanymi konstrukcjami genowymi (rozdział Metody 4.2.3). Po 72 godzinach od transfekcji, komórki zebrano, a uzyskane osady komórkowe poddano lizie w buforze Prot S-100 celem uwolnienia frakcji cytoplazmatycznej, a następnie wirowano, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody 4.2.4. Otrzymany supernatant inkubowano ze złożem agarozowym ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel opłaszczonym przeciwciałem anty-Flag Tag, celem immunoprecypitacji białka. Elucję związanego ze złożem białka przeprowadzono z wykorzystaniem peptydu 3x Flag. Otrzymane preparaty białkowe poddano analizie jakościowej i ilościowej poprzez przeprowadzenie rozdzielania elektroforetycznego

białek w 8% żelu PAA, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (Rysunek 11) (rozdział Metody 4.3.2).



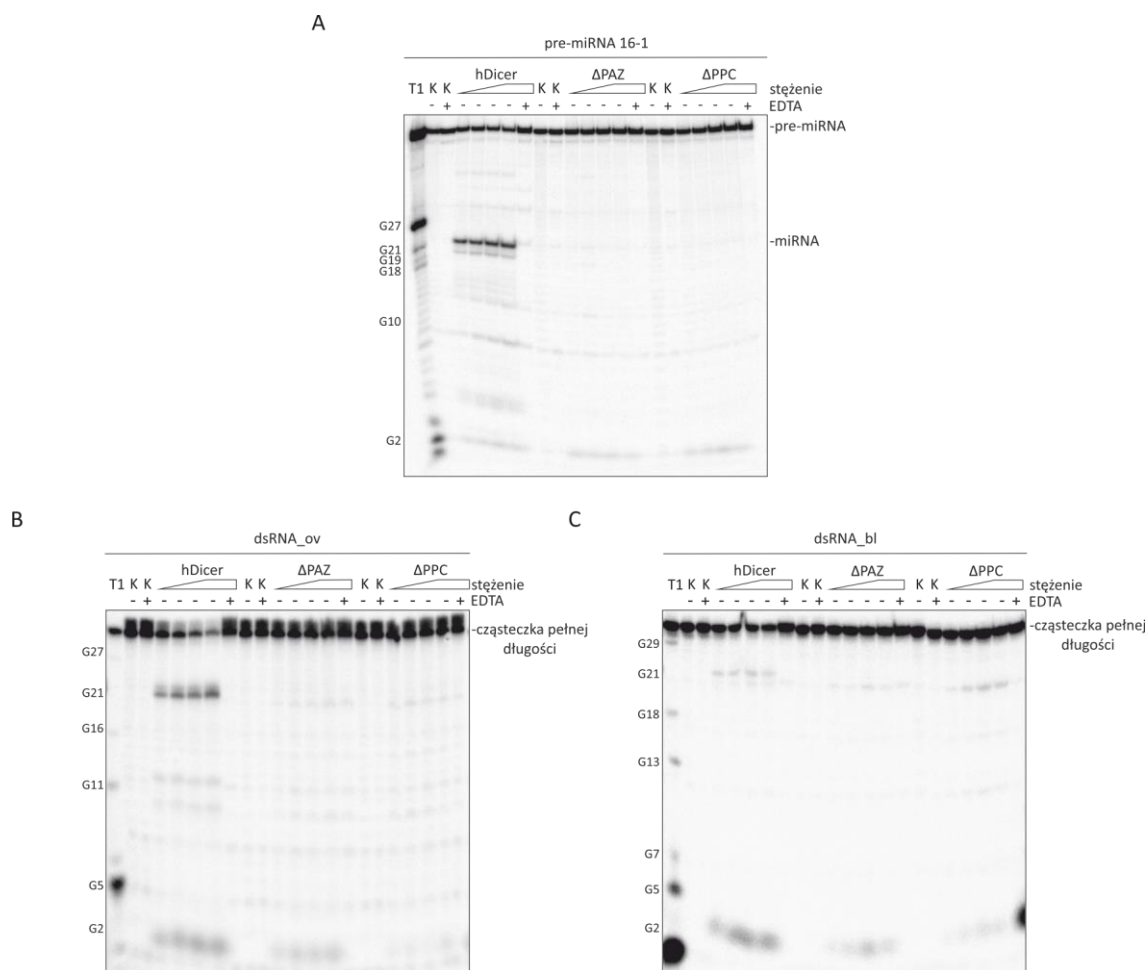
Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie architektury hDicer oraz wariantów z delecją domeny PAZ: Δ PAZ i Δ PPC (A). Rozdział elektroforetyczny preparatów białkowych: wt hDicer, Δ PAZ i Δ PPC w denaturującym żelu PAA wybarwionym kumasyną (panel górny) oraz analiza Western blottingu z przeciwciałami anti-Dicer (panel dolny) (B). Rysunek przygotowany na podstawie publikacji Wojnicka i wsp. [142].

Do określenia stężenia białka wykorzystano rozcieńczenia BSA o znanym stężeniu. Dodatkowo, obecność białka hDicer oraz wariantów delecyjnych Δ PAZ i Δ PPC w uzyskanych preparatach białkowych potwierdzono metodą Western blottingu, wykorzystując przeciwciała pierwszorzędowe anti-Dicer (F-10): sc-136979 (rozdział Materiały 3.8 oraz Metody 4.3.4). Przykładowa analiza Western blottingu preparatów białkowych została przedstawiona na Rysunku 11B (panel dolny).

Początkowo, otrzymane preparaty białkowe badano pod kątem aktywności RNazowej. W tym celu użyto: (i) pre-miRNA (pre-miRNA 16-1) oraz dwa dupлекsy RNA o długości 30 pz: (ii) dupleks posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (dsRNA_ov) oraz (iii) dupleks z tępo zakończonymi końcami (dsRNA_blunt). Reakcje cięcia były przeprowadzone ze wzrastającym stężeniem białka (12,5; 25; 50; 75 nM) oraz ~5 nM substratu: pre-miRNA

16-1 znakowanym izotopem ^{32}P na końcu 5' lub dsRNA (dsRNA_ov lub dsRNA_bl), w którym jedna z dwóch nici była znakowana izotopem ^{32}P na końcu 5'. Jako kontrolę, przygotowano dwie reakcje bez białka: jedną zawierającą sam substrat w buforze reakcyjnym (K-), drugą zawierającą substrat w buforze reakcyjnym z dodatkiem 25 mM EDTA (K+EDTA). Kontrole te pozwoliły na monitorowanie integralności substratu w trakcie jego inkubacji w samym buforze reakcyjnym. Dodatkowo, przygotowano reakcję kontrolną zawierającą substrat, 75 nM białka i 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). Należy wspomnieć, że EDTA poprzez chelatowanie kationów Mg^{2+} obecnych w buforze reakcyjnym hamuje specyficzne cięcie substratu przez RNazy III (rozdział Metody 4.1.11). Reakcje inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 15% denaturującym żelu PAA i wizualizowano za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 12). Do określenia długości generowanych produktów cięcia zastosowano marker długości w postaci produktów trawienia substratu przez RNazę T1. RNaza T1 jest specyficzną wobec ssRNA endorybonukleazą, która hydrolizuje wiązania fosfodiesterowe występujące po 3' G.

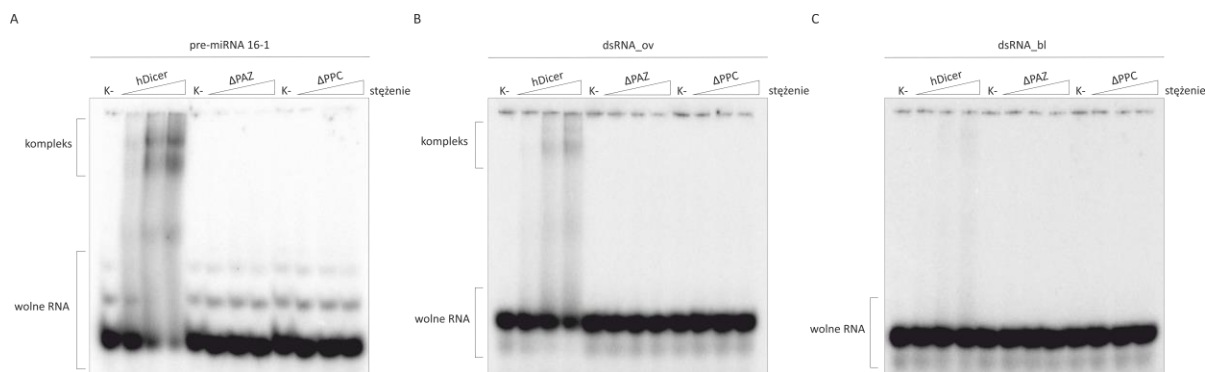
Wyniki rozdzielania elektroforetycznego ujawniły, że w reakcjach z substratem pre-miRNA 16-1, wt hDicer wydajnie generowała produkt cięcia o długości ~22 nt (tj. długości miRNA), natomiast nie zaobserwowano specyficznych produktów cięcia w reakcjach przeprowadzonych z preparatami ΔPAZ i ΔPPC (Rysunek 12A). W przypadku reakcji z udziałem substratu dsRNA_ov, wt hDicer wytwarzała wydajnie produkt o długości 21 nt, podczas gdy w reakcjach prowadzonych z białkami ΔPAZ i ΔPPC nie zaobserwowano takiego produktu cięcia. W przypadku reakcji przeprowadzonych z substratem dsRNA_bl, zaobserwowano niewielkie ilości produktu o długości ~21 nt w przypadku reakcji z wt hDicer i brak takich produktów w reakcjach z preparatami ΔPAZ i ΔPPC (Rysunek 12C). Dodatkowo, we wszystkich przeprowadzonych reakcjach dla wt hDicer, zarówno z substratem pre-miRNA 16-1, dsRNA_ov, jak i dsRNA_bl (Rysunek 12A, B, C), zaobserwowano krótkie produkty o długości ~2-3 nt, które gromadziły się wraz ze wzrostem stężenia wt hDicer. Produkty te obserwowano również w reakcjach z wariantami ΔPAZ i ΔPPC , choć w zastosowanych warunkach reakcyjnych powstawały one ze zdecydowanie mniejszą wydajnością. We wszystkich reakcjach kontrolnych produkty RNA o długości ~2-3 nt nie były obserwowane. Warto wspomnieć, że produkty RNA o długości ~2-5 nt, powstające w wyniku cięcia przez Dicer zarówno substratów RNA o strukturze spinki do włosów jak i dsRNA, były obserwowane także przez inne grupy badawcze [143].



Rysunek 12. Porównanie aktywności RNazowej preparatów białkowych: wt hDicer oraz wariantów Δ PAZ i Δ PPC względem kanonicznych substratów hDicer (A, B, C). Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanych izotopem ^{32}P na końcu 5' substratów RNA: pre-miRNA 16-1 (A), dsRNA_ov (B), dsRNA_bl (C). Trójkątami oznaczono wzrastające stężenie białka użyte w reakcji, które wynosiło odpowiednio: 12,5, 25, 50, 75 nM. (K-) substrat inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka; (K+EDTA) substrat inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka z dodatkiem 25mM EDTA; (+EDTA) uzupełnienie buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. (T1) produkt trawienia substratu RNazą T1. Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA. Rysunek przygotowany na podstawie publikacji Wojnicka i wsp. [142].

Ponadto, dla substratu pre-miRNA 16-1 zaobserwowano nieznaczny jego fragmentację w reakcjach kontrolnych K-, w buforze reakcyjnym. Fragmentacja ta była spowodowana przypuszczalnie nieenzymatyczną hydrolizą RNA zależną od jonów Mg^{2+} . Po dodaniu EDTA, który chelatuje jony Mg^{2+} , zaobserwowano znaczący spadek fragmentacji substratu.

Równolegle przeprowadzono testy aktywności wiązania substratów pre-miRNA 16-1, dsRNA_ov i dsRNA_bl przez wt hDicer oraz warianty Δ PAZ i Δ PPC. W reakcjach zastosowano ~ 5 nM znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' pre-miRNA 16-1 lub substrat dsRNA (dsRNA_ov lub dsRNA_bl), w którym jedna z dwóch nici była znakowana izotopem ^{32}P na końcu 5'. Reakcje prowadzono ze wzrastającym stężeniem białka (12,5; 50; 100 nM) (Rysunek 13). Jako kontrolę przygotowano reakcję bez białka (rozdział Metody 4.1.12).

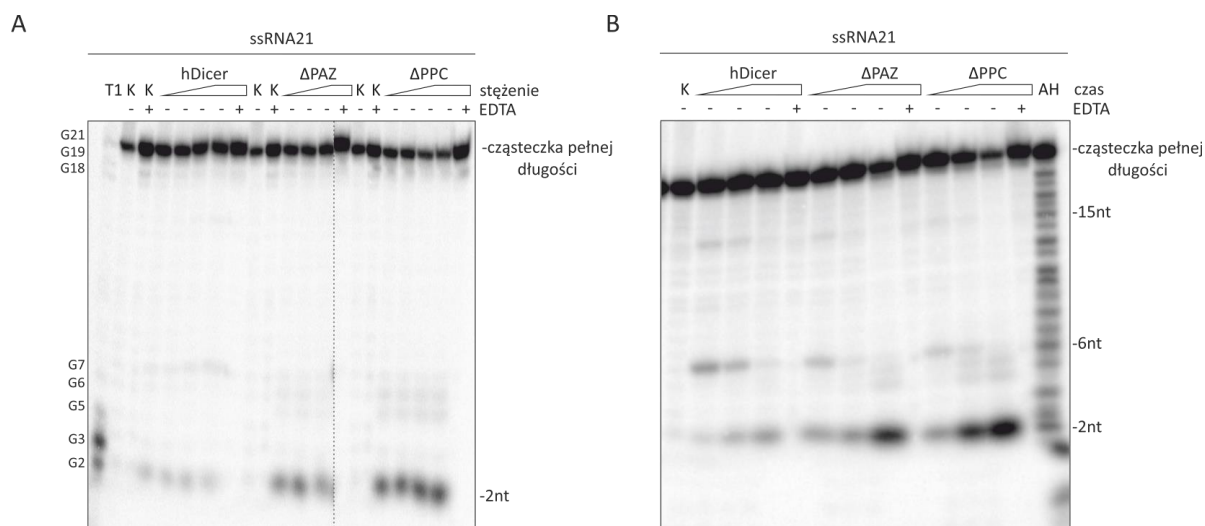


Rysunek 13. Wiązanie substratów RNA przez warianty delecyjne hDicer: Δ PAZ i Δ PPC. Do badania aktywności wiązania kwasów nukleinowych wykorzystano substrat: pre-miRNA 16-1 (A), dsRNA_ov (B) oraz dsRNA_bl (C). Znakowane izotopem ^{32}P substraty RNA inkubowano w buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem preparatów białkowych: hDicer, Δ PAZ i Δ PPC. Trójkątami oznaczono wzrastające stężenie białka w reakcji, które wynosiło odpowiednio: 12,5, 50, 100 nM. Rozdział prowadzono w 5% natywnym żelu PAA.

Zgromadzone wyniki wykazały, iż w reakcjach z pre-miRNA 16-1 oraz dsRNA_ov wiązanie substratów zachodziło tylko w przypadku reakcji prowadzonych z użyciem wt hDicer, natomiast kompleksów białko-kwas nukleinowy nie zaobserwowano w przypadku reakcji przeprowadzonych z preparatami Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 13A i B). W przypadku reakcji przeprowadzonych z dsRNA_bl i hDicer, zaobserwowano jedynie bardzo słaby, rozmyty sygnał pochodzący przypuszczalnie od szeregu kompleksów hDicer-dsRNA_bl, co może wskazywać na niestabilność tego kompleksu i jego rozpad podczas rozdzielania w żelu PAA. Dla substratu dsRNA_bl nie zaobserwowano żadnych kompleksów białko-kwas nukleinowy w reakcjach przeprowadzonych z preparatami Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 13C).

Podsumowując, zebrane wyniki wykazały, iż warianty delecyjne hDicer pozbawione domeny PAZ lub kasety PPC nie generowały produktów cięcia o długości miRNA oraz siRNA, co przypuszczalnie było związane z brakiem możliwości wiązania pre-miRNA oraz dsRNA przez wspomniane warianty delecyjne.

Wyniki wyżej opisanych doświadczeń, dotyczących reakcji cięcia (Rysunek 12), wykazały, iż w reakcjach cięcia z wt hDicer, Δ PAZ i Δ PPC powstają krótkie produkty RNA o długości ~2-3 nt. W kolejnym kroku postanowiono zatem sprawdzić, czy zaobserwowane produkty RNA o długości ~2-3 nt mogą powstawać w wyniku przecinania krótkich RNA o długości miRNA/siRNA. W badaniach tych zastosowano jednoniciowy oligonukleotyd o długości miRNA/siRNA: 21 nt RNA (ssRNA21). Testy cięcia przeprowadzono ze wzrastającym stężeniem białka (12,5; 25; 50; 75 nM) oraz ~5 nM substratu ssRNA21 znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' (rozdział Metody 4.1.11). Jako kontrolę, przygotowano dwie reakcje bez białka: jedną zawierającą sam substrat w buforze reakcyjnym (K-), drugą zawierającą substrat w buforze reakcyjnym z dodatkiem 25 mM EDTA (K+EDTA). Kontrole te pozwalały na monitorowanie integralności substratu w trakcie inkubacji w samym buforze reakcyjnym. Dodatkowo, przygotowano reakcję kontrolną zawierającą substrat, 75 nM białka i 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). W celu określenia długości generowanych produktów cięcia zastosowano marker długości w postaci produktów alkalicznej hydrolizy substratu. W zastosowanych warunkach reakcyjnych zaobserwowano, iż wszystkie białka: wt hDicer, Δ PAZ i Δ PPC generowały ~2 nt produkty RNA z końca 5' substratu ssRNA21 (Rysunek 14A). Produkty te nie były obserwowane we wszystkich reakcjach kontrolnych. Co ciekawe, zauważono również, że ~2 nt produkty RNA były generowane znacznie wydajniej w reakcjach z udziałem białek Δ PAZ i Δ PPC, w porównaniu z odpowiednimi reakcjami z udziałem wt hDicer (Rysunek 14A). Następnie sprawdzono jak przebiega proces cięcia cząsteczek ssRNA21 w wybranych punktach czasowych. Reakcje prowadzono w czasie: 15 minut, 30 minut i 60 minut, przy stężeniu białka 50 nM. Po pierwszych 15 minutach reakcji zaobserwowano produkty RNA o długości 15, 6 i 2 nt, jednakże poziom akumulacji tych produktów różnił się pomiędzy reakcjami przeprowadzonymi z białkiem typu dzikiego i wariantami Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 14B). W przypadku wt hDicer, po 15 minutach reakcji, najintensywniejszy sygnał pochodził od produktu o długości 6 nt. Dla białek Δ PAZ i Δ PPC po 15 minutach reakcji, najintensywniejszy sygnał pochodził od produktu o długości 2 nt. Wraz z upływem czasu inkubacji, dla wszystkich białek zaobserwowano zanikanie produktów o długości 15 i 6 nt oraz akumulację produktu o długości 2 nt. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że obserwowany produkt o długości ~2 nt powstawał w wyniku przycinania

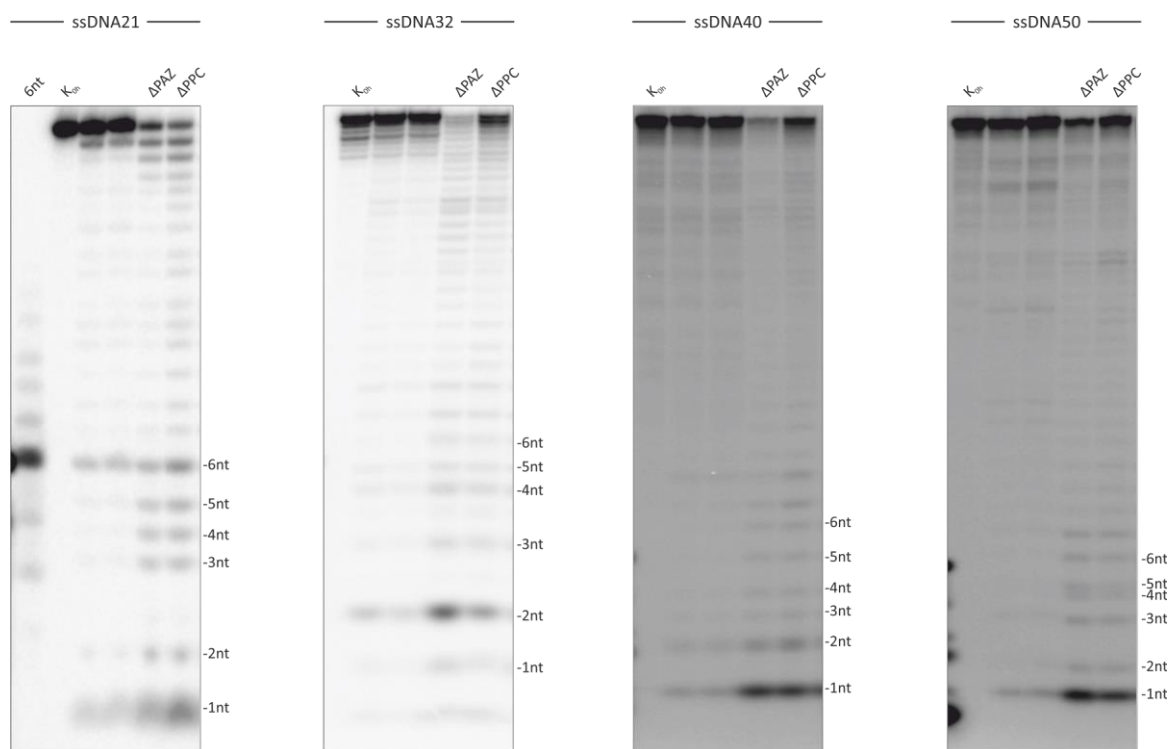


Rysunek 14. Aktywność RNazowa preparatów białkowych: wt hDicer oraz wariantów Δ PAZ i Δ PPC względem krótkiego, jednoniciowego substratu RNA. Reakcje cięcia przeprowadzone ze wzrastającym stężeniem białka i znakowanym izotopem ^{32}P na końcu 5' substratem ssRNA21 (A). Trójkątami oznaczono wzrastające stężenie białka użyte w reakcji, które wynosiło odpowiednio: 12,5, 25, 50, 75 nM. Reakcje cięcia zależne od czasu dla ssRNA21 (B). Trójkątami oznaczono wzrastający czas inkubacji, który wynosił odpowiedni: 15 minut, 30 minut, 1 godzina. Reakcje przeprowadzono w obecności 50 nM białka w mieszaninie reakcyjnej. (K-) substart inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka; (K+EDTA) substart inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka, z dodatkiem 25 mM EDTA; (+EDTA) uzupełnienie buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. (AH) produkt alkalicznej hydrolizy substratu. Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA. Rysunek przygotowany na podstawie publikacji Wojnicka i wsp. [142].

substratu o długości miRNA/siRNA (licząc od strony 5'), do produktów, kolejno 15, 6 i ostatecznie 2 nt. Podobnie jak w przypadku reakcji cięcia z substratem pre-miRNA 16-1 (Rysunek 12A) zaobserwowano nieznaczną fragmentację substratu ssRNA21 w reakcjach kontrolnych K-, która była spowodowana przypuszczalnie nieenzymatyczną hydrolizą RNA zależną od jonów Mg^{2+} .

Podsumowując, zebrane dane potwierdziły, że kasteta PPC zawierająca kieszenie wiążące koniec 3' i 5' substratu pre-miRNA lub dsRNA jest niezbędna do generowania przez hDicer produktów hydrolizy o długości miRNA oraz siRNA. Co więcej, zebrane dane ujawniły, że hDicer może docinać RNA o długości miRNA/siRNA i że w procesie tym przypuszczalnie nie uczestniczy domena PAZ, bądź cała kasetta PPC hDicer. Uzyskane wyniki sugerują, że hDicer mogłaby uczestniczyć w procesie degradacji nici pasażerskiej uwalnianej z dupleksu miRNA podczas tworzenia aktywnego kompleksu RISC.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy warianty hDicer pozbawione domen kotwiczących substrat pre-miRNA i dsRNA mogą wykazywać aktywność DNazową. W tym celu przeprowadzono reakcje cięcia, w których zastosowano jednoniciowe cząsteczki DNA (ssDNA) o długości: 21, 32, 40 i 50 nt. Mieszanina reakcyjna zawierała 12,5 nM białka oraz ~5 nM znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' substratu ssDNA. Jako kontrolę przygotowano reakcję bez białka zawierającą substrat w buforze reakcyjnym (K_{0h}). Mieszanki reakcyjne inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddawano rozdzielni elektroforetycznej w 20% denaturującym żelu PAA i uwidoczniono za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 15). Do określenia długości generowanych produktów cięcia zastosowano marker długości w postaci cząsteczki ssDNA o długości 6 nt.

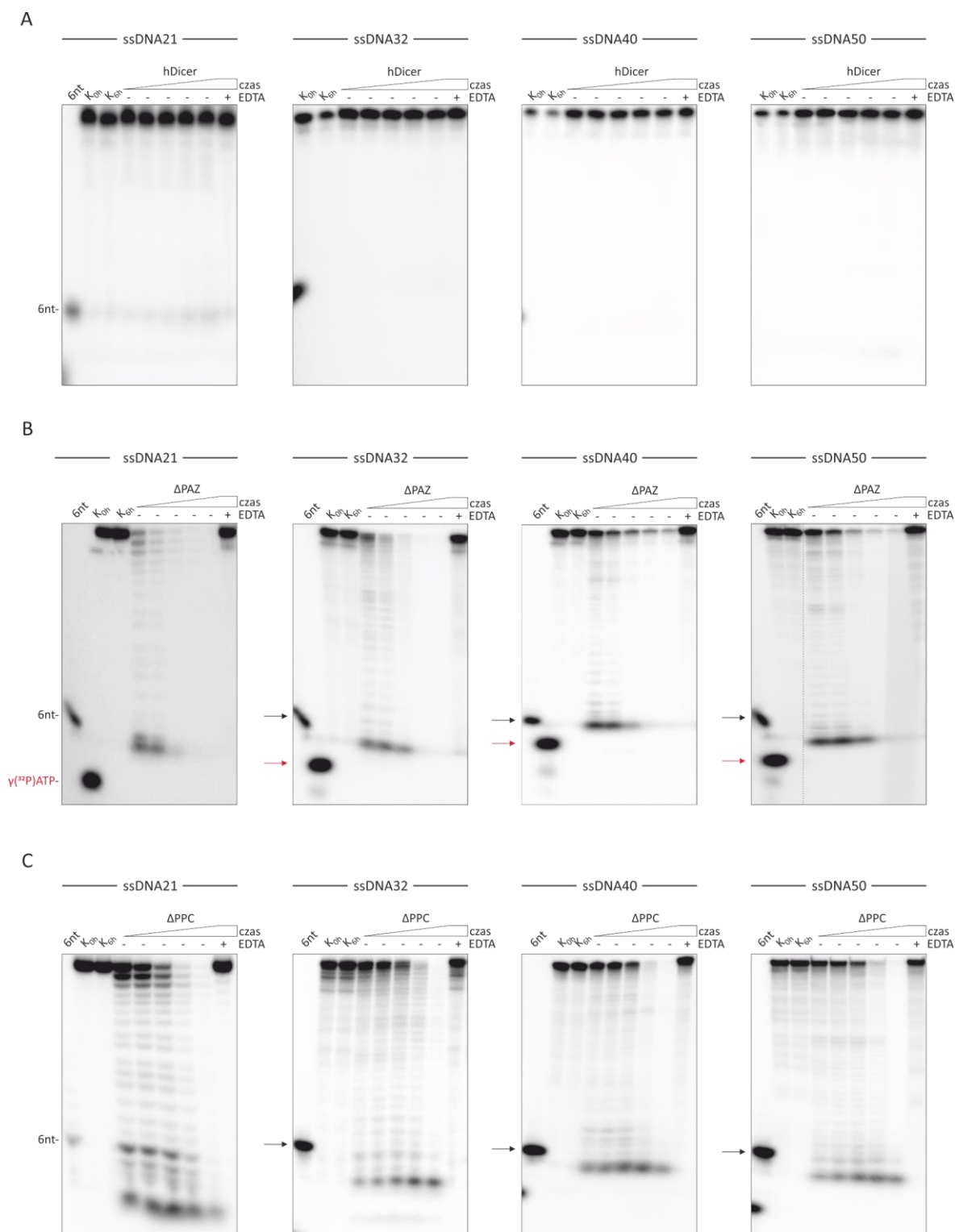


Rysunek 15. Aktywność DNazowa wariantów hDicer ΔPAZ i ΔPPC . Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanych izotopem ^{32}P na końcu 5' substratów ssDNA: ssDNA o długości 21 nt (ssDNA21), ssDNA o długości 32 nt (ssDNA32), ssDNA o długości 40 nt (ssDNA40) i ssDNA o długości 50 nt (ssDNA50). Reakcje przeprowadzono w obecności 12,5 nM białka w mieszaninie reakcyjnej. (K_{0h}) kontrola bez białka. (6nt) ssDNA o długości 6 nt. Rozdział prowadzono w 20% denaturującym żelu PAA.

Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, iż oba testowane warianty: Δ PAZ i Δ PPC w podobny sposób hydrolizowały użyte w reakcjach substraty. Dla reakcji z ssDNA21 zaobserwowano generowanie produktów cięcia w zakresie od 20 do 1 nt. Dla ssDNA32 zaobserwowano generowanie produktów cięcia w zakresie od 31 do 1 nt. Dla ssDNA40 zaobserwowano generowanie produktów cięcia w zakresie od 39 do 1 nt; dla ssDNA50 zaobserwowano generowanie produktów cięcia w zakresie od 49 do 1 nt. Ponadto, w reakcjach z białkiem Δ PAZ i substratami ssDNA32, ssDNA40 i ssDNA50 zaobserwowano znaczący zanik substratu, w porównaniu do reakcji z wariantem Δ PPC (Rysunek 15).

W celu porównania aktywności DNazowej wariantów Δ PAZ i Δ PPC, w kolejnym etapie badań sprawdzono akumulację produktów hydrolizy substratów w czasie. Mieszanina reakcyjna zawierała ~ 5 nM substratu ssDNA znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' oraz preparat białkowy w stężeniu 12,5 nM. Dodatkowo przygotowano reakcje kontrolne z udziałem preparatu wt hDicer. Przygotowano także dwie kolejne reakcje kontrolne: zawierającą substrat w buforze reakcyjnym w czasie 0 (K_{0h}), oraz kontrolę zawierającą substrat w buforze reakcyjnym, inkubowaną przez 6 godzin w 37 °C (K_{6h}). Kontrole te pozwalały na monitorowanie integralności substratu w trakcie inkubacji w samym buforze reakcyjnym. Dodatkowo przygotowano reakcję kontrolną obejmującą substrat, 12,5 nM białka i 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). Mieszaniny reakcyjne inkubowano w temperaturze 37 °C przez 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godziny, 6 godzin, a następnie poddawano rozdzielni elektroforetycznemu w 15% denaturującym żelu PAA i uwidocznilo za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 16).

W reakcjach z ssDNA21 produkty cięcia o długości w zakresie od 20 do 1 nt były generowane przez preparaty Δ PAZ i Δ PPC. Produktów cięcia nie zaobserwowano w reakcjach z wt hDicer oraz we wszystkich reakcjach kontrolnych, również w kontroli z białkiem z dodatkiem 25 mM EDTA. Uzyskane wyniki były zgodne z wynikami badań, które zostały przedstawione na Rysunku 15, które wskazywały, iż aktywność hydrolityczna preparatu Δ PAZ była znacznie wydajniejsza, w porównaniu do aktywności hydrolitycznej preparatu Δ PPC. W przypadku reakcji z Δ PAZ, po 3 godzinach od rozpoczęcia inkubacji zaobserwowano całkowity zanik substratu. W przypadku reakcji z Δ PPC całkowity zanik substratu zaobserwowano dopiero po upływie 6 godzin od momentu rozpoczęcia inkubacji substratu z białkiem.



Rysunek 16. Porównanie aktywności DNazowej preparatów białkowych: wt hDicer oraz wariantów delecyjnych domeny PAZ względem substratów ssDNA (A, B, C). Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem jednoniciowych znakowanych izotopem ³²P na końcu 5' substratów DNA: ssDNA21, ssDNA32, ssDNA40, ssDNA50 oraz 12,5 nM preparatu: wt hDicer (A), ΔPAZ (B) i ΔPPC (C). Trójkątami oznaczono wzrastający czas inkubacji, który wynosił odpowiednio: 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godziny, 6 godzin. (K_{0h}) substart w buforze reakcyjnym bez białka w czasie 0; (K_{6h}) substart inkubowany w buforze reakcyjnym

bez białka przez 6 godzin; (+EDTA) uzupełnienie buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. Marker wielkości (6nt) ssDNA o długości 6 nt (oznaczony czarnymi strzałkami). $\gamma(^{32}\text{P})\text{ATP}$ izotop (oznaczony czerwonymi strzałkami). Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA.

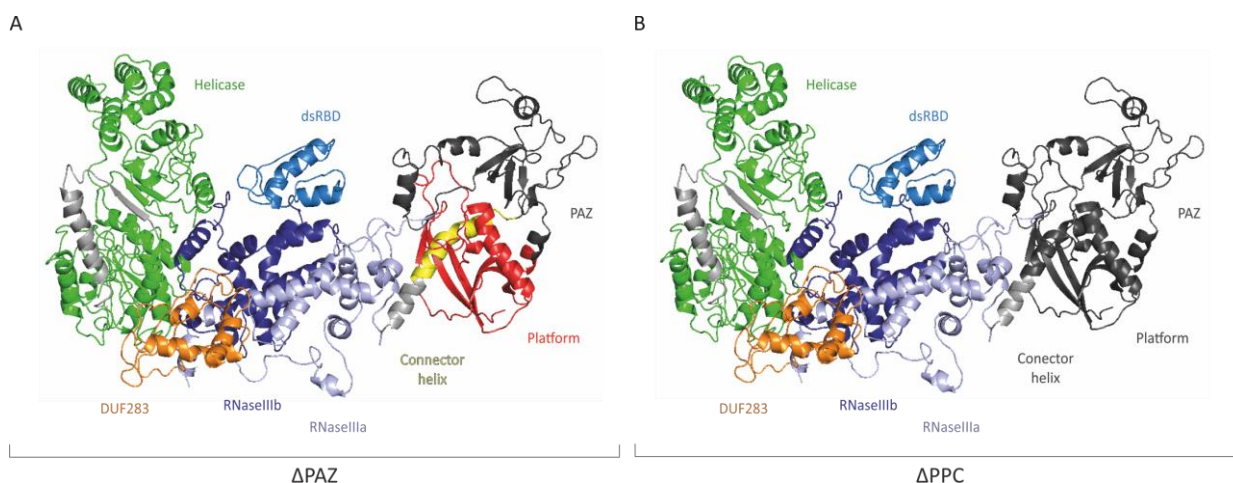
Podobne wyniki uzyskano dla reakcji z wykorzystaniem dłuższego substratu — ssDNA32. W reakcjach z cząsteczką ssDNA32 preparaty ΔPAZ i ΔPPC generowały produkty cięcia o długości w zakresie od 31 do $\sim 1/2$ nt. Ponownie zaobserwowano, iż w reakcji z ΔPAZ hydroliza substratu była znacznie wydajniejsza, w porównaniu do reakcji z ΔPPC . W reakcji z ΔPAZ całkowity zanik substratu zaobserwowano po upływie 3 godzin od momentu rozpoczęcia inkubacji substratu z białkiem. Natomiast całkowity zanik substratu dla reakcji z ΔPPC zaobserwowano po upływie 6 godzin od rozpoczęcia inkubacji substratu z białkiem. Produktów cięcia nie zaobserwowano w reakcjach z wt hDicer oraz we wszystkich reakcjach kontrolnych, również w kontroli z białkiem z dodatkiem 25 mM EDTA. Dla reakcji z cząsteczkami ssDNA40 i ssDNA50 z udziałem białek ΔPAZ i ΔPPC zaobserwowano generowanie produktów cięcia w zakresie długości odpowiednio od 39 do 1 oraz od 49 do 1 nt. Podobnie jak w reakcjach z krótszymi substratami, wydajność hydrolizy dłuższych substratów była większa dla ΔPAZ , w porównaniu do reakcji z ΔPPC . Ponownie, produktów cięcia nie zaobserwowano w reakcjach z hDicer oraz we wszystkich reakcjach kontrolnych, również w kontroli z białkiem z dodatkiem 25 mM EDTA.

Podsumowując, zebrane wyniki sugerują, iż usunięcie domeny PAZ/kasety PPC umożliwia dostęp ssDNA do centrum aktywnego takiego wariantu delecyjnego hDicer. Co więcej, obserwowane skracanie substratu ssDNA (znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5') o 1 nukleotyd sugeruje aktywność egzonukleazową 3' \rightarrow 5' wariantów ΔPAZ i ΔPPC .

Wyniki przedstawione w tej części rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w: „Unknown Areas of Activity of Human Ribonuclease Dicer: A Putative Deoxyribonuclease Activity”, w czasopiśmie *Molecules* (2020), Wojnicka i wsp.

5.1.2 Aktywność DNazowa wariantów Δ Helikaza, Δ Helikaza-DUF283, Δ DUF(630-709aa) oraz Δ DUF(625-752aa) hDicer

Biorąc pod uwagę trzeciorzędową strukturę hDicer, kasetka PPC zlokalizowana jest w obrębie „głowy” białka (Rysunek 4B) i kontroluje dostęp substratów do domen RNazowych od strony „głowy” hDicer (Rysunek 17). Po przeciwnej stronie białka (w tzw. „podstawie”, Rysunek 4) znajdują się domeny helikazowa oraz DUF283. Domena helikazowa jest zaangażowana w oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA, co pozwala na dopasowanie tego substratu w obrębie centrum katalitycznego enzymu, a także na dyskryminację pomiędzy substratami pre-miRNA i dsRNA [90]. Usunięcie domeny helikazowej zwiększa procesywność enzymu względem cząsteczek pre-siRNA, co wskazuje, że domena ta ogranicza dostęp dsRNA do domen RNazowych hDicer [72, 73, 98].



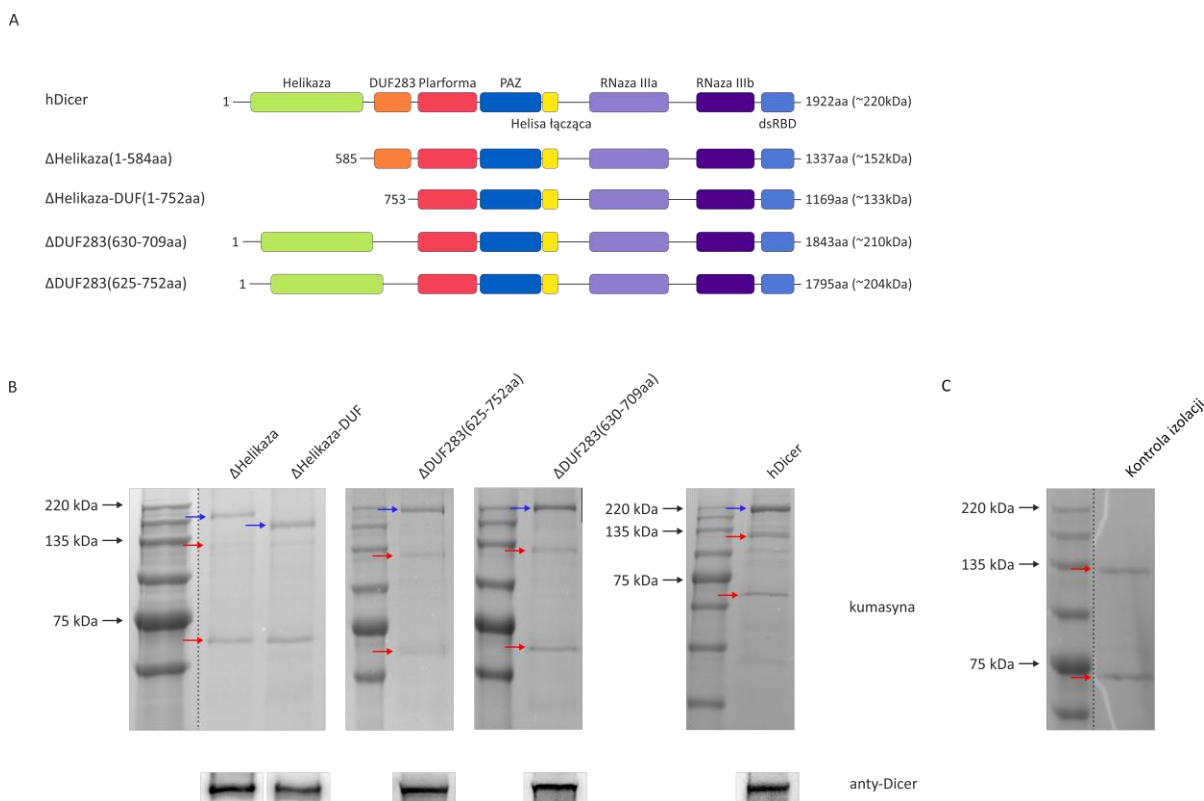
Rysunek 17. Struktura trzeciorzędowa hDicer. Kolorem czarnym zaznaczono usunięte fragmenty w wariantach Δ PAZ (A) i Δ PPC (B). Struktury zobrazowano w programie PyMOL na podstawie kodu: 5ZAL z bazy danych PDB [74]. Rysunek na podstawie publikacji Wojnicka i in. [142].

W celu sprawdzenia, czy domena helikazowa i domena DUF283 mogą ograniczać potencjalną aktywność DNazową hDicer, przeprowadzono reakcje cięcia substratów ssDNA z użyciem następujących wariantów delecyjnych hDicer: (i) wariantu pozbawionego domeny helikazowej (Δ Helikaza), (ii) wariantu pozbawionego domeny helikazowej oraz DUF283 (Δ Helikaza-DUF283), (iii) wariantu pozbawionego domeny DUF283 z mniejszą delecją (Δ DUF283(630-709aa)) i (iv) wariantu pozbawionego domeny DUF283 z większą delecją

(Δ DUF283(625-752aa)). Należy zaznaczyć, iż warianty delecyjne Δ Helikaza oraz Δ Helikaza-DUF283 zostały uprzednio scharakteryzowane pod względem aktywności RNazowej przez grupę badawczą prof. Narry Kim [131], a konstrukcje genowe niosące sekwencje je kodujące są komercyjnie oferowane przez firmę Addgene (www.addgene.org). Wariant Δ Helikaza posiada zdolność generowania miRNA, natomiast wariant Δ Helikaza-DUF283 nie posiada zdolności do produkcji miRNA [131]. Warianty Δ DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa) zostały scharakteryzowane pod względem aktywności RNazowej w Szczepanska A., Wojnicka M. i wsp. [100]. Badania te wykazały, iż wariant Δ DUF(630-709aa) w warunkach *in vitro* prezentował podobną aktywność RNazową wobec użytych pre-miRNA i pre-siRNA, co wt hDicer. Natomiast wariant Δ DUF(625-752aa), wobec tych samych substratów, wykazywał zdecydowanie słabszą aktywność RNazową [100].

W celu otrzymania preparatów białkowych, wektory niosące sekwencje kodujące odpowiednie warianty delecyjne hDicer: *hDicer_ΔDUF283(625-752aa)::3xFlag*, *hDicer_ΔDUF283(630-709aa)::3xFlag*, *pcDNA3.1-FLAG-Dicer-ΔHelicC*, *pcDNA3.1-FLAG-Dicer-ΔDUF* zostały wykorzystane do transfekcji komórek HEK293T No_Dice. Wszystkie warianty delecyjne produkowane były w komórkach w fuzji ze znacznikiem 3xFlag Tag na końcu N lub C białka. Po 48 godzinach (dla wariantów Δ Helikaza oraz Δ Helikaza-DUF283) lub 72 godzinach (dla wariantów Δ DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa)) od transfekcji komórki zebrano, a otrzymane osady komórkowe poddano lizie w buforze Prot S-100 celem uwolnienia frakcji białek cytoplazmatycznych. Następnie lizat komórek wirowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody 4.2.4. Otrzymany supernatant inkubowano ze złożem agarozowym ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel opłaszczonym przeciwciałem anti-Flag Tag celem immunoprecypitacji białka. Elucję związanego ze złożem białka przeprowadzono z wykorzystaniem peptydu 3x Flag (rozdział Metody 4.3.1). Otrzymane preparaty białkowe poddano analizie jakościowej i ilościowej poprzez przeprowadzenie rozdzielania elektroforetycznego białek w 8% żelu PAA w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (rozdział Metody 4.3.2). Do określenia stężenia białka wykorzystano rozcieńczenia BSA o znanym stężeniu. Reprezentatywne próbki preparatów białkowych przedstawiono na Rysunku 18. Dodatkowo obecność wariantów delecyjnych: Δ Helikaza, Δ Helikaza-DUF283, Δ DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa) w uzyskanych preparatach białkowych potwierdzono metodą Western blotting wykorzystując przeciwciała pierwszorzędowe anti Dicer (F-10): sc-136979 (Rozdział Materiały 3.8).

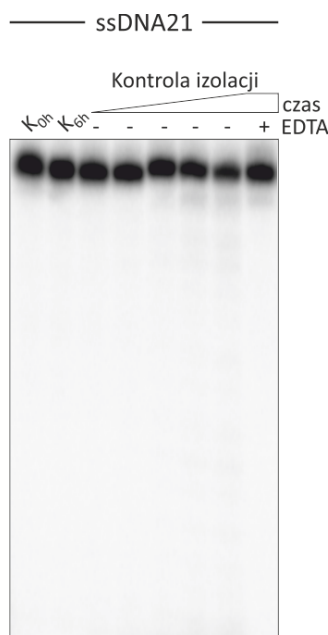
Przykładowa analiza Western blotting preparatów białkowych została przedstawiona na Rysunku 18B (panel dolny).



Rysunek 18. Schematyczne przedstawienie budowy hDicer oraz wariantów z delecją: domeny helikazowej (ΔHelikaza), domeny helikazowej oraz DUF283 (ΔHelikaza-DUF283), domeny DUF283 (ΔDUF283(630-709aa) oraz ΔDUF283(625-752aa)) (A). Rozdział elektroforetyczny preparatów białkowych: wt hDicer, ΔHelikaza, ΔHelikaza-DUF283, ΔDUF283(630-709aa) oraz ΔDUF283(625-752aa) w denaturującym żelu PAA wybarwionym kumasyną (panel górny) oraz analiza Western blotting z przeciwciałami anty-Dicer (panel dolny) (B). Niebieskimi strzałkami zaznaczono hDicer lub jej odpowiednie warianty delecyjne. Czerwonymi strzałkami zaznaczono białka współcyszczające się z preparatami hDicer. Rozdział elektroforetyczny preparatu kontrolnego zawierającego białko współcyszczające się z hDicer (C).

Wyniki rozdzielania elektroforetycznego otrzymanych preparatów białkowych ujawniły obecność dwóch białek o masie ~72 i ~120 kDa współcyszczających się zarówno z hDicer, jak i poszczególnymi wariantami delecyjnymi hDicer. Białka te, w postaci wyciętych z żelu prążków, zostały poddane analizie metodą spektrometrii mas w celu ich identyfikacji. Otrzymane wyniki wskazały, iż białkiem o masie ~72 kDa była N-metylotransferaza argininowa 5 (ANM5), natomiast białkiem o masie ~120 kDa było białko typu kinezy (KIF11). Oba te białka nie prezentują aktywności hydrolitycznej wobec kwasów

nukleinowych. Należy wspomnieć, iż w badaniach aktywności Dicer powszechnie wykorzystywane są niehomogenne preparaty Dicer [131, 144-146]. Niemniej jednak, celem sprawdzenia, czy współcyszczające się białka mogą wpływać na integralność testowanych substratów przygotowano tzw. „kontrolę izolacji”. W tym celu osad komórkowy pochodzący z komórek HEK293T No_Dice traktowanych odczynnikami do transfekcji, poddano takiej samej procedurze oczyszczania jak hDicer i jej warianty delecyjne. Otrzymany preparat został przedstawiony na Rysunku 18C. W preparacie tym można zaobserwować obecność prążków odpowiadających masie ~72 i ~120 kDa. Przeprowadzone analizy potwierdziły, że obserwowane białka to ANM5 oraz KIF11. W celu potwierdzenia, iż „kontrola izolacji” nie wpływa na integralność substratów ssDNA przeprowadzono kontrolną reakcję cięcia. Reakcja cięcia przeprowadzona była z ~12,5 nM preparatu białkowego oraz ~5 nM znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' substratu ssDNA21. Reakcje inkubowano w temperaturze 37 °C przez: 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godziny, 6 godzin. Jako kontrolę przygotowano dwie reakcje: kontrolę zawierającą substrat w buforze reakcyjnym w czasie 0 (K_{0h}), oraz kontrolę zawierającą substrat w buforze reakcyjnym, inkubowaną przez 6 godzin w temperaturze 37 °C (K_{6h}). Kontrole te pozwalały na monitorowanie integralności substratu w trakcie inkubacji w samym buforze reakcyjnym. Dodatkowo przygotowano reakcję kontrolną zawierającą substrat, 12,5 nM białka i 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). Reakcje poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 15% denaturującym żelu PAA i uwidocznilo za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 19).

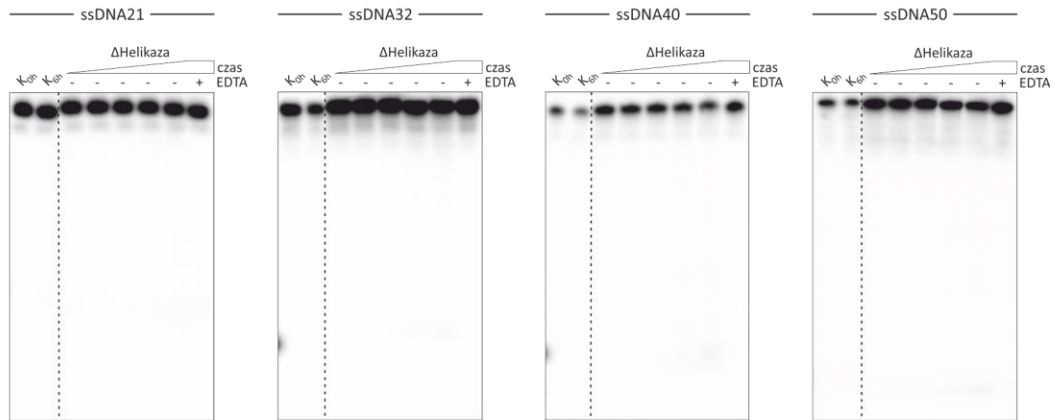


Rysunek 19. Testowanie potencjalnej aktywności DNazowej preparatu „kontrola izolacji”. Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanego na końcu 5' substratu ssDNA21. Trójkątem zaznaczono wzrastający czas inkubacji, który wynosił odpowiednio: 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godziny, 6 godzin. (K_{0h}) substart w buforze reakcyjnym bez białka w czasie 0; (K_{6h}) substart inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka przez 6 godzin; (+EDTA) uzupełnienie buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA.

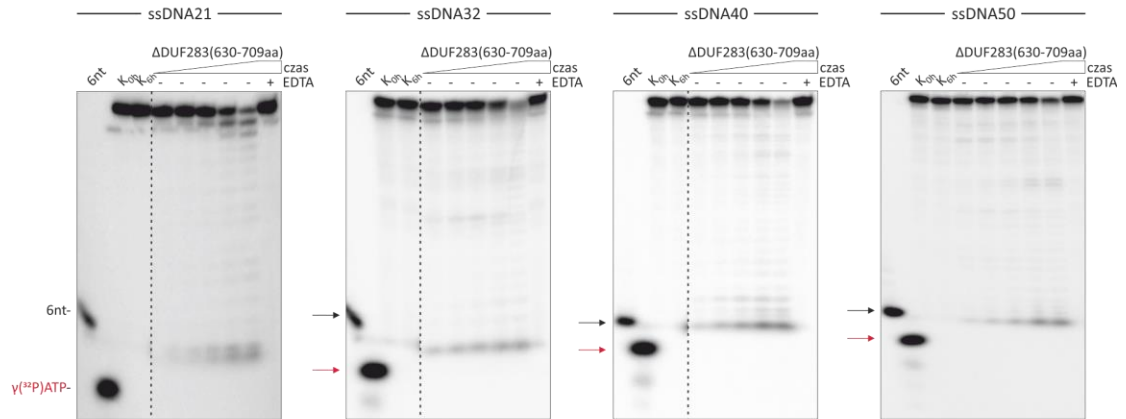
Otrzymane wyniki wykazały, że preparat zawierający białka ANM5 i KIF11 nie prezentuje aktywności nukleazowej względem substratów ssDNA.

Następnie, otrzymane preparaty białkowe: Δ Helikaza, Δ Helikaza-DUF283, Δ DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa) testowano pod kątem aktywności DNazowej z wykorzystaniem jednoniciowych cząsteczek DNA o długości 21, 32, 40 i 50 nt. Reakcje cięcia przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanym schematem dla preparatu „kontrola izolacji”. Reakcje poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w 15% denaturującym żelu PAA i uwidoczniło za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 20). W zastosowanych warunkach reakcyjnych, aktywność DNazową wykazywały jedynie warianty pozbawione domeny DUF283: Δ DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa) (Rysunek 20).

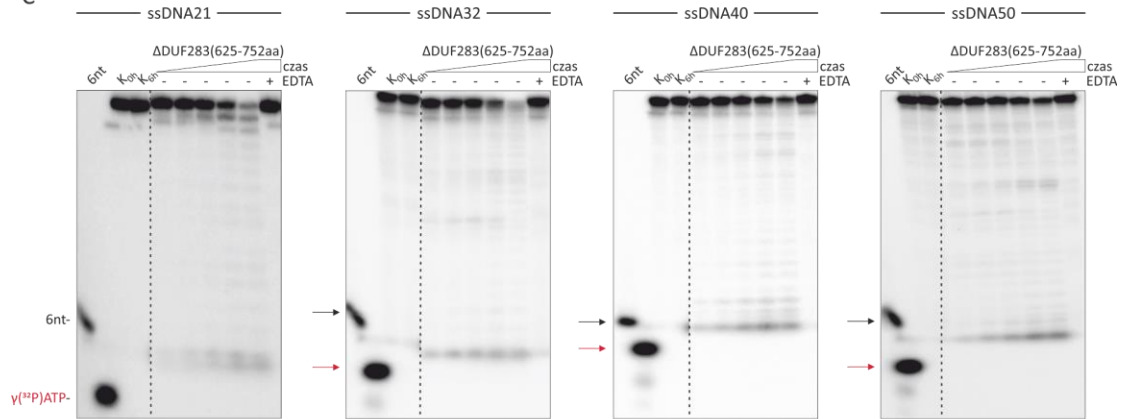
A



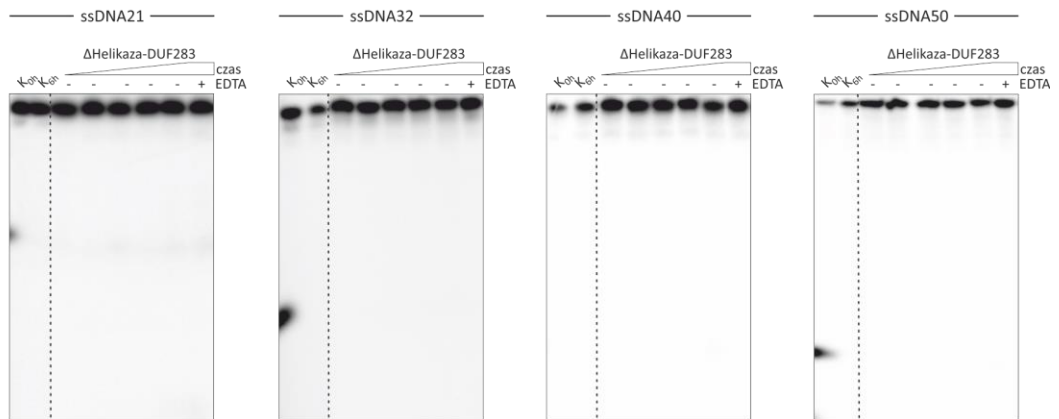
B



C

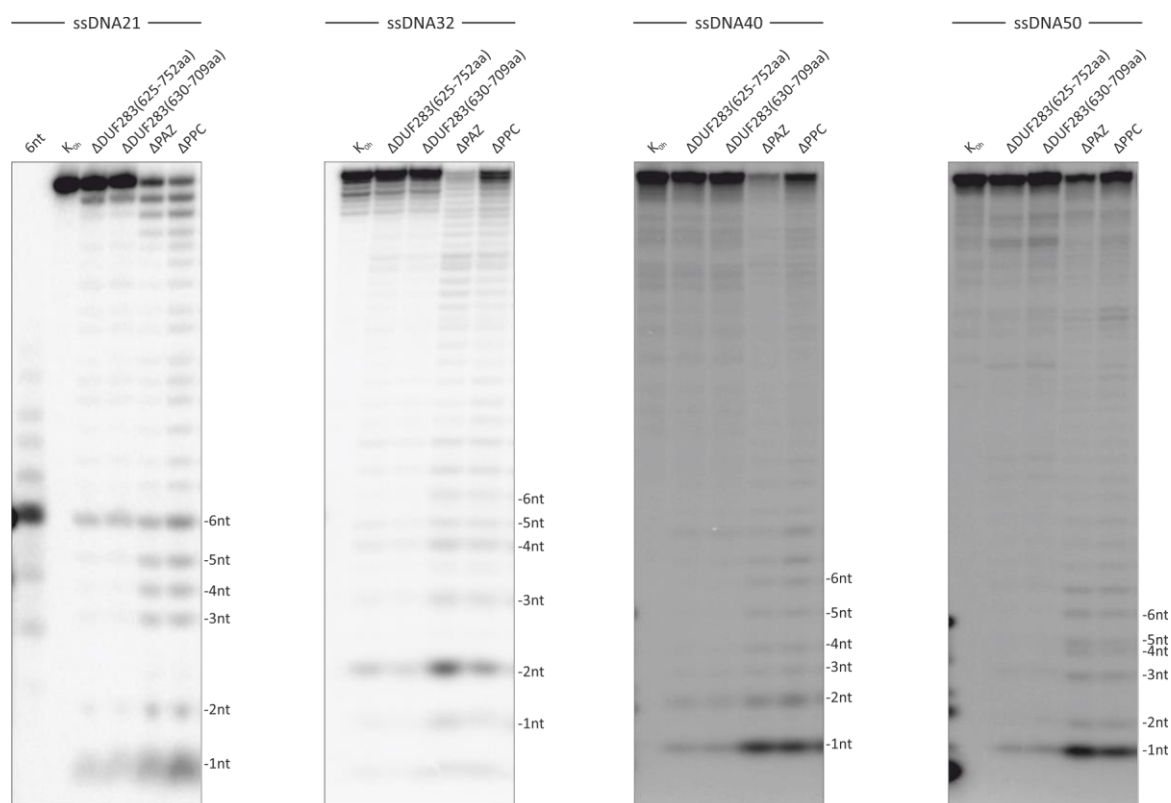


D



Rysunek 20. Porównanie aktywności DNazowej preparatów białkowych wariantów delecyjnych hDicer pozbawionych domeny Helikazowej oraz DUF283 względem jednoniciowych substratów DNA (A, B, C, D). Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanych izotopem ^{32}P na końcu 5' substratów ssDNA: ssDNA21, ssDNA32, ssDNA40, ssDNA50 oraz 12,5 nM preparatu: Δ Helikaza (A), Δ DUF283(630-709aa) (B), Δ DUF283(625-752aa) (C) i Δ Helikaza-DUF283 (D). Trójkątami oznaczono wzrastający czas inkubacji, który wynosił odpowiednio: 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godziny, 6 godzin. (K_{0h}) substart w buforze reakcyjnym bez białka w czasie 0; (K_{6h}) substart inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka przez 6h; (+EDTA) uzupełnienie buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. Marker wielkości (6nt) ssDNA o długości 6 nt (oznaczony kolorem czarnym). $\gamma(^{32}\text{P})\text{ATP}$ izotop (oznaczony kolorem czerwonym). Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA.

Niezależnie od długości zastosowanej cząsteczki DNA, warianty DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa) generowały szereg produktów cięcia. Produktów tych nie zaobserwowano w reakcjach kontrolnych, również w kontroli z białkiem, z dodatkiem 25 mM EDTA oraz w reakcjach z „kontrolą izolacji” (Rysunek 19). W celu uzyskania lepszej rozdzielczości sygnałów pochodzących od produktów generowanych przez warianty Δ DUF283(630-709aa) i Δ DUF283(625-752aa), podobnie jak w przypadku reakcji z Δ PAZ i Δ PPC, mieszaniny reakcyjne rozdzielano także w 20% żelu PAA. Mieszaniny reakcyjne zawierały 12,5 nM białka oraz ~5 nM znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' ssDNA. Jako kontrolę przygotowano reakcje bez białka zawierającą substrat w buforze reakcyjnym (K_{0h}). Mieszaniny reakcyjne inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 20% denaturującym żelu PAA i uwidoczniło za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 21).

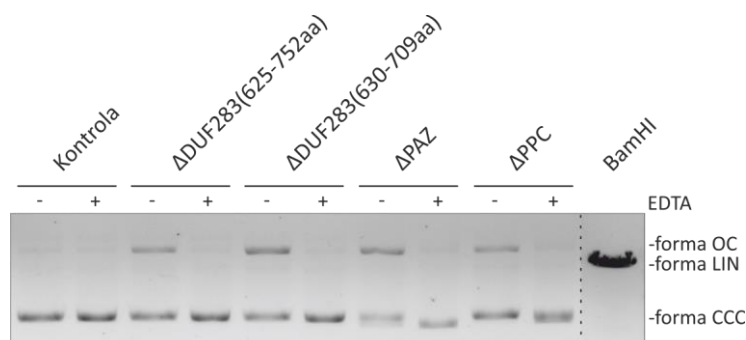


Rysunek 21. Aktywność DNazowa wariantów delecyjnych hDicer pozbawionych domeny DUF283: Δ DUF283(630-709aa) i Δ DUF283(625-752aa). Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanych na końcu 5' jednoniciowych substratów DNA: ssDNA o długości 21 nt (ssDNA21), ssDNA o długości 32 nt (ssDNA32), ssDNA o długości 40 nt (ssDNA40) i ssDNA o długości 50 nt (ssDNA50). Reakcje przeprowadzono w obecności 12,5 nM białka w mieszaninie reakcyjnej. (K_{oh}) kontrola bez białka. Marker długości (6nt) ssDNA o długości 6 nt. Rozdział prowadzono w 20% denaturującym żelu PAA. Fragmenty rysunku zostały uprzednio wykorzystane do zaprezentowania aktywności DNazowej wariantów hDicer pozbawionych domeny PAZ (Rysunek 15).

Na podstawie zebranych wyników zaobserwowano, iż warianty Δ DUF283(630-709aa) i Δ DUF283(625-752aa) hydrolizowały dany rodzaj substratu ssDNA21, ssDNA32, ssDNA40, ssDNA50 w podobny sposób. W reakcji z cząsteczką ssDNA21 warianty te generowały wyraźne produkty cięcia o długości 20 nt, 6 nt, 2 nt i 1 nt, natomiast w reakcji z ssDNA32, ssDNA40 i ssDNA50 dla obu wariantów delecyjnych zaobserwowano generowanie wyraźnych produktów cięcia o długości $\sim 1/2$ nt. Produktów cięcia nie zaobserwowano we wszystkich reakcjach kontrolnych. Warto zauważyć, iż w porównaniu do wariantów Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 15 i 16), warianty Δ DUF283(630-709aa) i Δ DUF283(625-752aa) generowały głównie krótkie produkty o długości $\sim 1/2$ nt (Rysunek 20 i 21). Wydajność generowania tych produktów przez warianty Δ DUF283(630-709aa) i Δ DUF283(625-752aa)

była znacznie mniejsza w porównaniu do wydajności generowania takich produktów przez warianty Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 20 i 21), w odpowiednich warunkach reakcyjnych. W przypadku reakcji z wt hDicer, wariantem Δ Helikaza i Δ Helikaza-DUF283 nie zaobserwowano żadnych produktów cięcia w reakcjach z testowanymi substratami ssDNA (Rysunek 16 i 20). Należy wspomnieć, iż wariant Δ Helikaza-DUF283 nie wykazuje również aktywności RNazowej [131].

Następnie postanowiono sprawdzić, czy warianty hDicer wykazujące aktywność hydrolityczną wobec ssDNA: Δ DUF283(630-709aa), Δ DUF283(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC, mogą także przecinać dsDNA. W tym celu, podobnie jak w przypadku eksperymentów z tDCR-1 z *C. elegans*, wykorzystano jako substrat pDNA (wektor *pUC19*; rozdział Materiały 3.4) [128]. W wyniku nacięcia pDNA przez tDCR-1 dochodziło do zmiany struktury plazmidu z tzw. konformacji natywnej superskręconej (CCC, ang. *covalently closed circles*) na kolistą zrelaksowaną (OC, ang. *open circle*) posiadającą przeciętą jedną z nici dsDNA. Jeśli obie nici plazmidowego dsDNA zostałyby przecięte, dochodziłoby do powstawania tzw. konformacji liniowej (LIN, ang. *linear*). Poszczególne konformacje pDNA różnią się szybkością migracji w żelu agarozowym, co umożliwia ich identyfikację. Konformacja superskręcona (CCC) migruje najszybciej, natomiast forma klista otarta (OC) migruje wolniej od superskręconej i zlinearyzowanej (LIN) [147]. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem 12,5 nM białka oraz 200 ng pDNA (rozdział Metody 4.1.11). Jako kontrolę przygotowano reakcje bez białka zawierającą pDNA w buforze reakcyjnym oraz reakcje z dodatkiem 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). Reakcje inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 0,7% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (rozdział Metody 4.1.1.2). Dodatkowo, przygotowano reakcję kontrolną w postaci pDNA zlinearyzowanego przy użyciu enzymu restrykcyjnego BamHI. Analizę rozdziału produktów cięcia pDNA w żelu agarozowym przeprowadzono z wykorzystaniem transiluminatora emitującego światło UV (Rysunek 22).



Rysunek 22. Potencjalna aktywność DNazowa wariantów delecyjnych hDicer: Δ DUF283(630-709aa), Δ DUF283(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC względem substratu dsDNA. Reakcje przeprowadzono w obecności 12,5 nM białka i 200 ng pDNA. (+EDTA) reakcja kontrolna z dodatkiem 25 mM EDTA. Rozdział prowadzono w 0,7% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Wyniki rozdziału elektroforetycznego ujawniły obecność formy naciętej (OC) w reakcjach dla wszystkich testowanych wariantów delecyjnych, tj. DUF283(630-709aa), Δ DUF283(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC. Dla żadnego z wariantów nie zaobserwowano obecności formy zlinearyzowanej (LIN), co sugeruje, że warianty te przypuszczalnie wiążą dsDNA, lecz nacinaniu ulega tylko jedna nić w duplesie DNA (Rysunek 22).

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, iż hDicer posiada potencjał do hydrolizy substratów DNA, jednakże dostęp tego typu substratów do centrum katalitycznego hDicer może być ograniczony przez obecność domen oskrzydających domeny RNazowe hDicer, takich jak DUF283, czy kasetę PPC (Rysunek 17). Co więcej, obserwowane skracanie substratu ssDNA (znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5'), od końca 3', o 1 nukleotyd przez warianty Δ PAZ i Δ PPC sugeruje potencjalną aktywność egzonukleazową 3' \rightarrow 5' hDicer (Rysunek 15 i 16).

5.2 Skrócone formy hDicer: charakterystyka wariantu Dicer1e

Drugi nurt badawczy pracy doktorskiej poświęcony był analizie wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1* i próbie zdefiniowania ich funkcji. W celu zidentyfikowania wariantów transkrypcyjnych *DICER1* przeprowadzone zostały analizy bioinformatyczne dostępnych baz danych. Analizy te rozpoczęto od przeszukiwania bazy danych Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), która zawiera dane dotyczące genomów kręgowców. W bazie tej, oprócz 7 izoform mRNA genu *DICER1* kodujących białko pełnej długości (wt hDicer), znaleziono także 5 izoform mRNA, w obrębie których występuje sekwencja

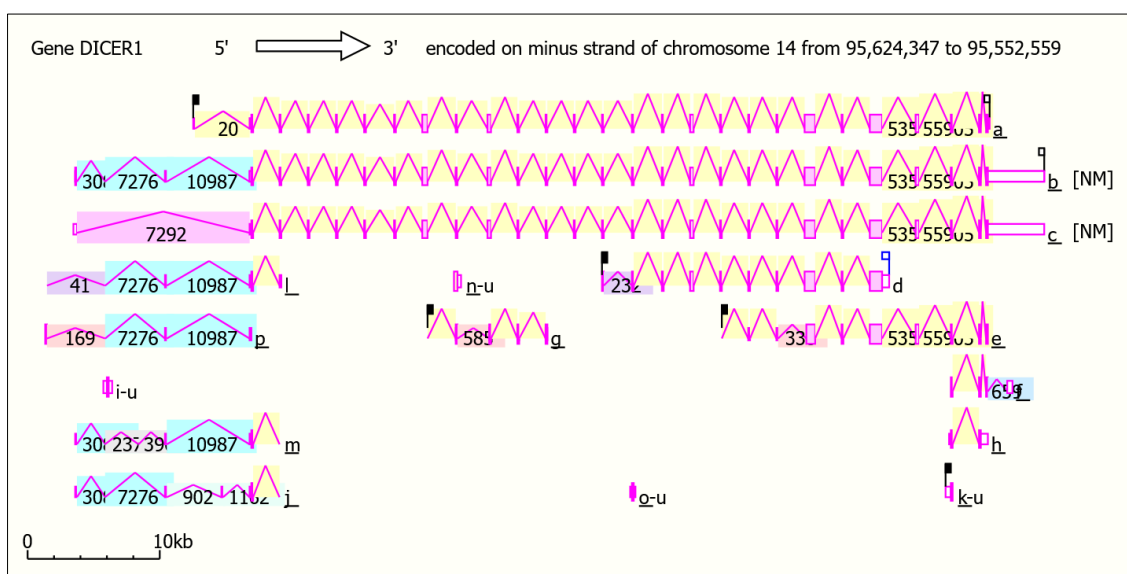
umożliwiająca prawdopodobnie powstanie skróconych form białka hDicer: *DICER1-210*, *DICER1-211*, *DICER1-220*, *DICER1-221*, *DICER1-224*. Izoformy te powstają w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *DICER1*. Zestawienie transkryptów *DICER1* potencjalnie kodujących skrócone warianty białka, przedstawiono w Tabeli 5.1. Obecność skróconej formy białka została potwierdzona dla *DICER1-211* [122] oraz *DICER1-210* [148]. Białka powstające na podstawie niniejszych transkryptów posiadają przypisany nr referencyjny w bazie danych UniProt. Analiza sekwencji aminokwasowych kodowanych przez izoformy: *DICER1-210*, *DICER1-211*, *DICER1-220* oraz *DICER1-221* wykazała, iż potencjalnie powstające białka posiadają domenę helikazową, DUF283, kasetę PPC, domenę RNazy IIIa oraz początkowy fragment (33 aa) domeny RNazy IIIb. Izoformy te nie posiadają natomiast domeny dsRBD. Izoforma *DICER1-224* zawiera sekwencję obejmującą 5 pierwszych egzonów genu *DICER1*, a potencjalne białko obejmuje fragment domeny helikazowej.

Tabela 5.1 Zestawienie transkryptów genu *DICER1* potencjalnie kodujących skrócone formy białka hDicer (na podstawie analizy bazy danych Ensembl).

Nr identyfikacyjny transkryptu	Nazwa	Długość transkryptu	Długość sekwencji aminokwasowej potencjalnie kodowanego białka	Nr referencyjny UniProt
ENST00000541352.5	DICER1-211	5621 nt	1829 aa	Q9UPY3-2
ENST00000696736.1	DICER1-220	6509 nt	1868 aa	-
ENST00000696737.1	DICER1-221	5815 nt	1715 aa	-
ENST00000532939.3	DICER1-210	5989 nt	1715 aa	H0YJZ6
ENST00000696740.1	DICER1-224	1188 nt	133 aa	-

W kolejnym etapie analiz bioinformatycznych wykorzystano program AceView (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>). Program AceView został opracowany przez National Center for Biotechnology Information (NCBI) i umożliwia analizę puli wszystkich dostępnych sekwencji mRNA oraz cDNA dla genów zdeponowanych

w bazach danych: GenBank, RefSeq, dbEST i Trace. Sekwencje te są dopasowywane do genomu, a następnie grupowane w zbiory zawierające alternatywne warianty transkrypcyjne danego genu. Dzięki możliwości przeszukania różnych źródeł danych, w tym głównie baz danych: PubMed, Genetic Association Database Resource, Entrez Gene Database oraz GenBank program AceView umożliwia analizę wybranego wariantu transkrypcyjnego pod względem takich cech jak: długość rejonu 5' i 3' UTR, sekwencje intronów i egzonów, rodzaj tkanek, w których ulega ekspresji, sekwencja aminokwasowa kodowanego białka, przypuszczalna funkcja białka wraz z jego lokalizacją subkomórkową, występowanie bliskich homologów białka u innych gatunków [149]. Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem programu AceView wykazały obecność 16 wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1*: 3 warianty kodujące wt hDicer oraz 13 wariantów potencjalnie powstających w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu, tzw. alternatywnych wariantów splicingowych. Wariantom tym zostały nadane litery indeksujące od *a* do *p* (Rysunek 23). Wybrane cechy zidentyfikowanych wariantów transkrypcyjnych *DICER1* przedstawiono w Tabeli 5.2.



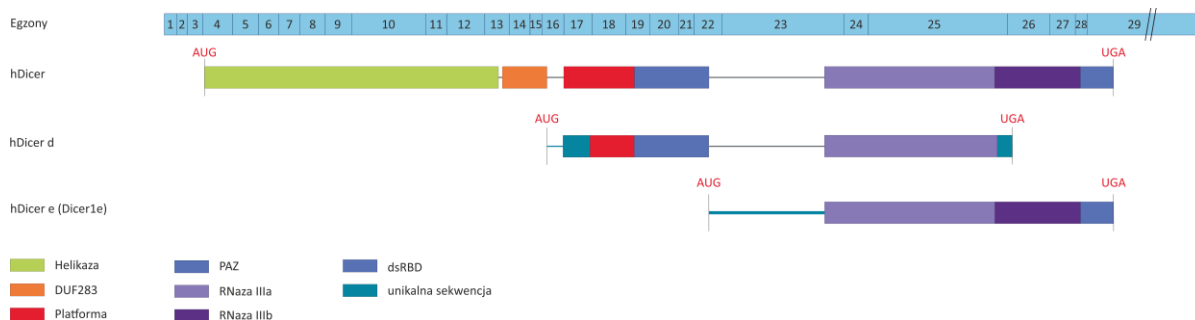
Rysunek 23. Schematyczne przedstawienie izoform pre-mRNA *DICER1*, wygenerowane przez program AceView. Egzony zaznaczono różowymi prostokątami; introny zaznaczono różową linią łamaną, sekwencje 3' UTR zaznaczono białym prostokątem.

Tabela 5.2. Zestawienie wybranych cech wariantów mRNA *DICER1* wygenerowanych przez program AceView.

Wariant mRNA	Długość mRNA	Długość sekwencji aminokwasowej potencjalnie kodowanego białka	Długość regionu 5' UTR	Długość regionu 3' UTR
<i>a</i>	6190 nt	1922 aa	250 nt	171 nt
<i>b</i>	10291 nt	1922 aa	253 nt	4269 nt
<i>c</i>	10277 nt	1922 aa	238 nt	4270 nt
<i>d</i>	3467 nt	997 aa	42 nt	431 nt
<i>e</i>	2776 nt	820 aa	283 nt	30 nt
<i>f</i>	711 nt			325 nt
<i>g</i>	590 nt			
<i>h</i>	858 nt			
<i>i-unspliced</i>	653 nt			
<i>j</i>	607 nt			
<i>k-unspliced</i>	578 nt			
<i>l</i>	500 nt			
<i>m</i>	498 nt			
<i>n-unspliced</i>	493 nt			
<i>o-unspliced</i>	337 nt			
<i>p</i>	329 nt			

Warianty *a*, *b* i *c* są to warianty mRNA *DICER1* kodujące białko wt hDicer, jednakże warianty te różnią się między sobą długością sekwencji 3' UTR. Długość regionu 3' UTR dla wariantu *a* wynosi 177 nt, natomiast dla wariantów *b* i *c* długość ta wynosi odpowiednio 4254 i 4267 nt. W obrębie regionu 3' UTR wariantów *b* i *c* występują miejsca docelowe dla cząsteczek miR-103/107 oraz let-7. Warianty *a*, *b* i *c* występują w bazie danych Ensembl pod numerem identyfikacyjnym odpowiednio: ENST00000527414.5, ENST00000526495.6 i ENST00000343455.8. Ponadto program AceView wykazał obecność dwóch skróconych

wariantów transkrypcyjnych *DICER1*: *d* i *e*, w obrębie których występuje otwarta ramka odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) (Rysunek 24).



Rysunek 24. Schematyczne przedstawienie dojrzałego transkryptu *DICER1* oraz dwóch wariantów splicingowych *d* i *e*, z uwzględnieniem rejonów kodujących poszczególne domeny hDicer.

Wariant *d* posiada sekwencję o długości 3467 nt, a występująca w jej obrębie otwarta ramka odczytu umożliwia powstanie skróconej formy białka o długości 997 aa i masie ~113 kDa. Wariant *d* obejmuje rejon pomiędzy egzonem 16 a egzonem 26 genu *DICER1*. W wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu dochodzi do zachowania fragmentu intronu 16 o długości 10 nt oraz fragmentu intronu 25 o długości 484 pz (Rysunek 24). Analiza sekwencji aminokwasowej skróconej formy białka hDicer generowanej przez wariant *d* wykazała, że powstające białko zawiera domenę Platformy, PAZ oraz krótki fragment domeny RNazy IIIa (Rysunek 24). Zachowanie fragmentów intronowych w wariantcie *d* powoduje, że kodowane białko posiada unikatową sekwencję N-kończącą o długości 34 aa oraz unikatową sekwencję C-kończącą o długości 17 aa, w porównaniu do sekwencji wt hDicer (Rysunek 24). Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż wariant transkrypcyjny *d* jest to wariant kodujący wcześniej opisaną izoformę Dicer d występującą w komórkach raka piersi o fenotypie epitelialnym (nabłonkowym) [124, 150].

Wariant *e* posiada sekwencję o długości 2776 nt, a występująca w jej obrębie otwarta ramka odczytu umożliwia powstanie skróconej formy białka o długości 820 aa i masie ~93 kDa. Wariant *e* obejmuje rejon pomiędzy egzonem 22 a egzonem 29 *DICER1*. W wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu dochodzi do wycięcia 5'-końcowego fragmentu egzonu 23 o długości 77 nt (Rysunek 24). W wyniku wycięcia fragmentu egzonu 23, powstające białko charakteryzuje się unikatową sekwencją N-kończącą o długości 13 aa

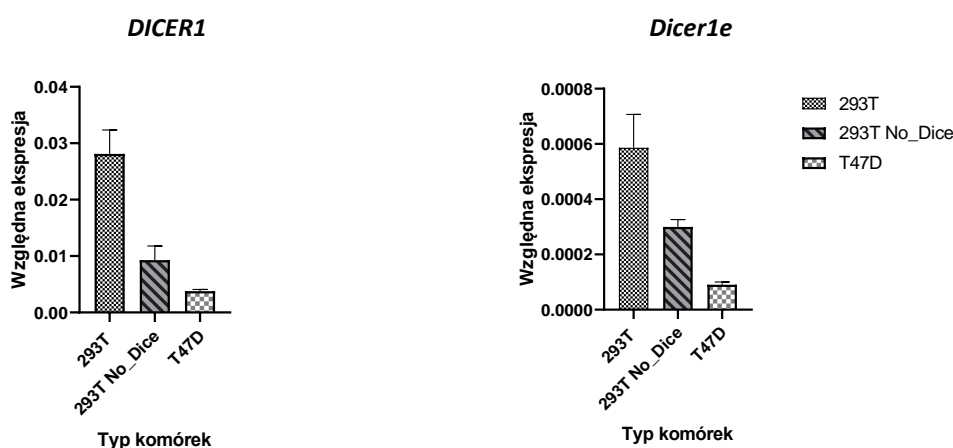
w porównaniu do sekwencji wt hDicer (Rysunek 24) [125]. Dostępne dane literaturowe wskazują, iż wariant *e* jest obecny w komórkach raka piersi o fenotypie nabłonkowym oraz w komórkach raka płaskonabłonkowego języka, gdzie został zdefiniowany jako *Dicer1e* [124, 125]. Co ciekawe, wyciszenie ekspresji *Dicer1e* w komórkach raka płaskonabłonkowego języka hamuje proliferację komórek oraz zwiększa ich wrażliwość na cisplatynę (czynnik hamujący replikację DNA i proliferację komórek). Mechanizm molekularny związany z nadwrażliwością na cisplatynę nie został jednak poznany [125].

Pozostałych 11 wariantów transkrypcyjnych: *f*, *g*, *h*, *i-unspliced*, *j*, *k-unspliced*, *l*, *m*, *n-unspliced*, *o-unspliced* i *p* posiada sekwencje nukleotydowe o długości poniżej 860 nt, w obrębie których nie występuje otwarta ramka odczytu, w wyniku czego z tych wariantów transkrypcyjnych najprawdopodobniej nie powstają białka.

5.2.1 Analiza obecności wariantu *Dicer1e* w komórkach HEK293T i HEK293T No_Dice

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wariantów transkrypcyjnych *DICER1* ujawniła występowanie tylko czterech form kodujących skróconą formę białka hDicer: *DICER1-210*, *DICER1-211*, *d* i *Dicer1e*. Z tych czterech form tylko wariant *Dicer1e* koduje białko posiadające obie funkcjonalne domeny RNazy III. Jak dotąd wariant *Dicer1e* został zidentyfikowany w komórkach raka piersi o fenotypie nabłonkowym [124] oraz w komórkach raka płaskonabłonkowego języka [125]. Początkowo postanowiono sprawdzić, czy wariant *Dicer1e* (zarówno mRNA, jak i kodowane przez niego białko) występuje w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice. W celu sprawdzenia, czy w analizowanych komórkach powstaje mRNA *Dicer1e* przeprowadzono analizy z wykorzystaniem ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) na matrycy cDNA uzyskanego w wyniku odwrotnej transkrypcji mRNA wyizolowanego z wyżej wymienionych komórek (rozdział Metody 4.1.14). Dodatkowo, przeprowadzono reakcje kontrolne, mające na celu detekcję mRNA *DICER1*. W reakcji qPCR wykorzystano startery różnicujące umożliwiające specyficzne wiązanie się tylko w obrębie komplementarych sekwencji cDNA *DICER1* lub *Dicer1e* (rozdział Materiały 3.5). Ponadto, jako kontrolę pozytywną w reakcji qPCR wykorzystano materiał cDNA uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji mRNA wyizolowanego z linii komórkowej raka piersi o fenotypie nabłonkowym T47D (linia komórkowa, w której pierwotnie zidentyfikowano obecność wariantu *Dicer1e*) [124].

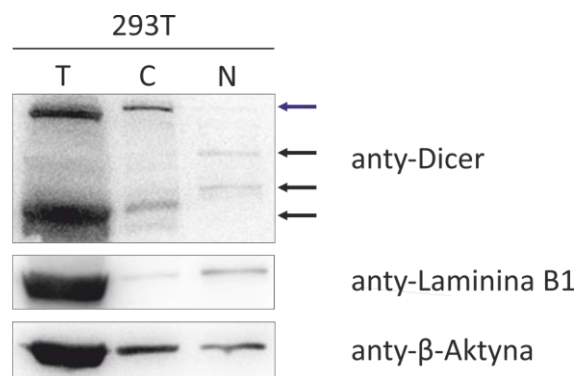
Uzyskane wyniki wykazały obecność zarówno fragmentu należącego do mRNA *DICER1*, jak i fragmentu należącego do mRNA *Dicer1e* w trzech analizowanych liniach komórkowych: HEK293T, HEK293T No_Dice i T47D (Rysunek 25). Najwyższy poziom obu analizowanych mRNA wykazywały komórki HEK293T. W przypadku komórek HEK293T No_Dice zaobserwowano około trzykrotnie niższy poziom zarówno mRNA *DICER1*, jak i mRNA *Dicer1e*, w porównaniu do komórek HEK293T. Należy zaznaczyć, iż obecna w komórkach HEK293T No_Dice mutacja typu *knock out* we wszystkich kopiach genu *DICER1* (brak fragmentu kodującego domenę helikazową) skutkuje brakiem powstawania białka wt hDicer [67], niemniej jednak w komórkach tych dochodziło do transkrypcji „uszkodzonego” genu *DICER1*. Spośród wszystkich badanych linii komórkowych, komórki T47D wykazywały najniższy poziom mRNA zarówno dla transkryptu *DICER1*, jak i wariantu *Dicer1e* (Rysunek 25).



Rysunek 25. Względny poziom produkcji mRNA *DICER1* i *Dicer1e* w komórkach: HEK293T, HEK293T No_Dice i T47D. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe (\pm SD) dla trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

Następnie sprawdzono poziom akumulacji białek: wt hDicer oraz *Dicer1e* w liniach komórkowych HEK293T i HEK293T No_Dice. W początkowym etapie pracy do analiz wykorzystano tylko komórki HEK293T. Materiał do badań stanowiły frakcje białek cytoplazmatycznych i jądrowych (rozdział Metody 4.2.5) oraz lizaty wyżej wspomnianych komórek, zawierające zarówno frakcje białek cytoplazmatycznych, jak i jądrowych (rozdział Metody 4.2.4). Zastosowane frakcjonowanie kompartmentów komórkowych na materiał pochodzący z cytoplazmy oraz jądra komórkowego związane jest z lokalizacją komórkową

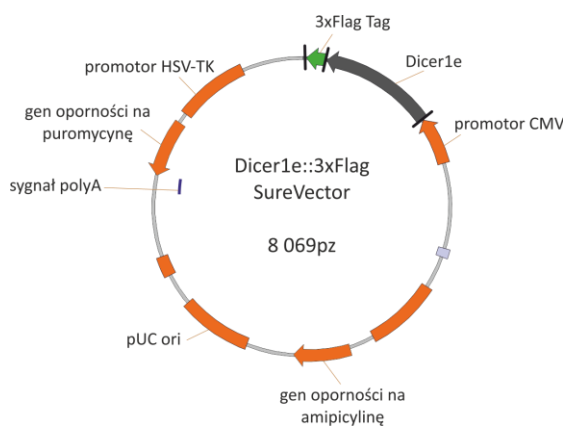
wariantu Dicer1e. Dicer1e zlokalizowana jest zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie [125]. Otrzymane lizaty komórkowe oraz preparaty białkowe poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w warunkach denaturujących w żelu PAA (rozdział Metody 4.3.2), a następnie przeprowadzono transfer półsuchy białek z żelu na membranę PVDF (rozdział Metody 4.3.3). Detekcję białka wt hDicer oraz jego skróconych form przeprowadzono za pomocą metody immunodetekcji (Western blotting) z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-Dicer (F-10): sc-136979 (rozdział Materiały 3.8). Przeciwciało to specyficznie rozpoznaje C-końcowy fragment hDicer obejmujący sekwencję pomiędzy aminokwasami w pozycji 1701 a 1922. Jako kontrolę izolacji dla frakcji jądrowej zastosowano przeciwciało pierwszorzędowe skierowane przeciwko białku jądrowemu Laminine B1 (ab16048) (rozdział Materiały 3.8). Przykładową analizę Western blotting białek przedstawiono na Rysunku 26.



Rysunek 26. Detekcja hDicer i jej skróconych form w komórkach HEK293T metodą Western blotting. (T) lizat komórkowy zawierający frakcję białek cytoplazmatycznych i jądrowych; (C) frakcja białek cytoplazmatycznych; (N) frakcja białek jądrowych. Niebieską strzałką zaznaczono sygnał dla wt hDicer. Czarnymi strzałkami zaznaczono sygnał pochodzący od niezidentyfikowanych izoform hDicer.

Przeprowadzone analizy Western blotting wykazały obecność w lizatach komórek HEK293T białka wt hDicer, jak również jego skróconych form, jednakże nie udało się jednoznacznie określić, czy jest to wariant Dicer1e. W celu sprawdzenia, czy w badanych liniach komórkowych powstaje białko Dicer1e, postanowiono stworzyć tzw. „kontrolę referencyjną”, którą stanowiłby wyprodukowany w komórkach wariant Dicer1e posiadający znacznik 3x Flag Tag. Do przygotowania konstrukcji genowej z sekwencją kodującą wariant Dicer1e zaopatrzony w znacznik 3x Flag Tag na końcu C, wykorzystano metodę PCR. Martycę w reakcji amplifikacji stanowił pDNA *hDicer::3xFlag* niosący sekwencję kodującą

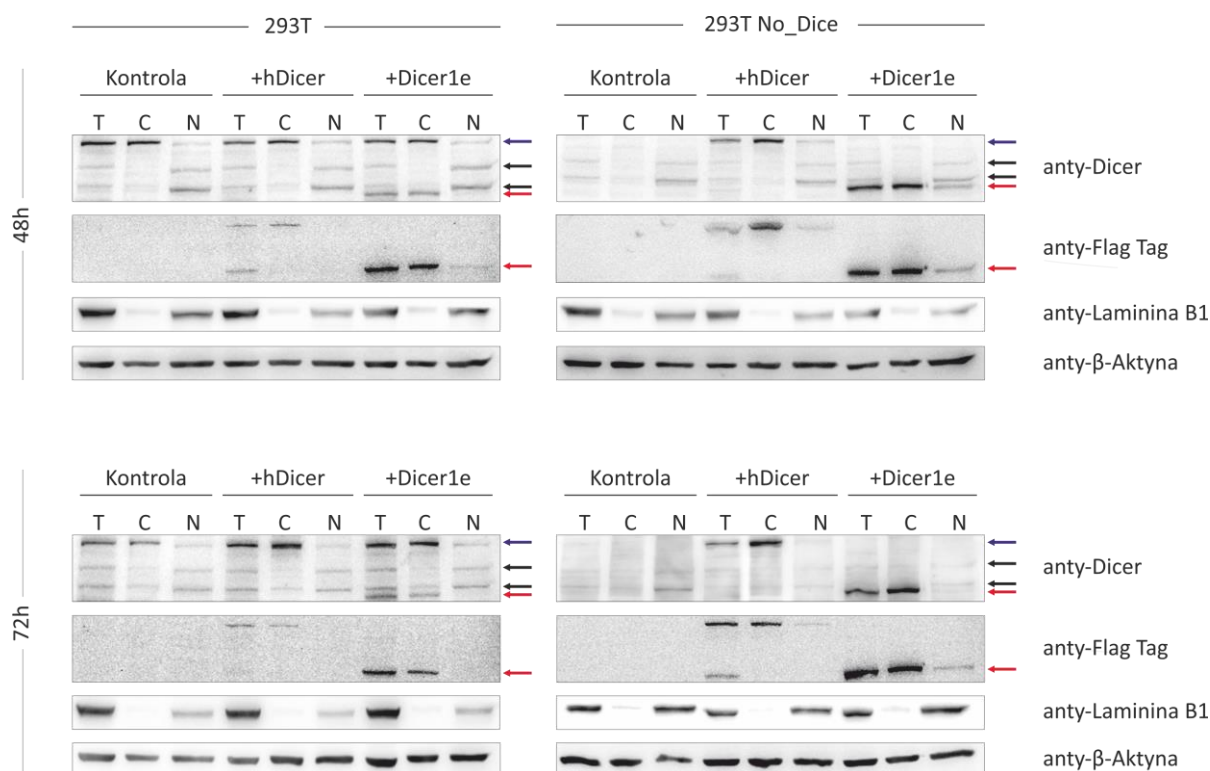
wt hDicer w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu C. Szczegółowy opis przygotowania konstrukcji genowej opisano w rozdziale Metody 4.1.2. Przygotowanym wektorem transformowano bakterie *E. coli*. Obecność zrekombinowanego wektora (zawierającego pożądaną wstawkę) w komórkach bakteryjnych potwierdzono z wykorzystaniem kolonijnej reakcji PCR, z użyciem starterów specyficznych dla sekwencji *DICER1* (rozdział Metody 4.1.4). Z wybranych, na podstawie kolonijnej reakcji PCR, pozytywnych klonów bakteryjnych wyizolowano pDNA. Otrzymany pDNA został wykorzystany jako matryca w reakcji sekwencjonowania metodą Sangera, w celu sprawdzenia zgodności sekwencji insertu z sekwencją referencyjną, a także poprawności zachowania ramki odczytu względem kodonu start oraz sekwencji kodującej znacznik 3x Flag Tag.



Rysunek 27. Uproszczony schemat budowy wektora SureVector wraz z wprowadzoną sekwencją kodującą *Dicer1e*, w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu C.

Konstrukcja genu *Dicer1e::3xFlag* została wprowadzona do komórek HEK293T oraz komórek HEK293T No_Dice metodą transfekcji. Jako kontrolę, do komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice wprowadzono konstrukcję genową *hDicer::3xFlag* (rozdział Metody 4.2.3). Materiał do badań stanowiły osady komórkowe zebrane po 48 i 72 godzinach od transfekcji. Z wszystkich przygotowanych osadów komórkowych, tj. osadów z komórek HEK293T: (i) typu dzikiego, (ii) transfekowanych *hDicer::3xFlag*, (iii) transfekowanych *Dicer1e::3xFlag* oraz osadów z komórek HEK293T No_Dice: (i) nietransfekowanych, (ii) transfekowanych *hDicer::3xFlag* oraz (iii) transfekowanych *Dicer1e::3xFlag* wyizolowano białka z jednoczesnym ich podziałem na frakcję pochodzącą z jądra komórkowego oraz frakcję pochodzącą z cytoplazmy (rozdział Metody 4.2.5). Do przygotowania lizatów komórkowych zawierających frakcje białek cytoplazmatycznych i jądrowych wykorzystano

bufor RIPA (rozdział Metody 4.2.4). Otrzymane lizaty komórkowe oraz preparaty białkowe poddano analizie metodą Western blotting, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Detekcję białka wt hDicer oraz jego skróconych form przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-Dicer (F-10): sc-136979 (rozdział Materiały 3.8) (Rysunek 28). W celu potwierdzenia, iż obserwowany sygnał dla Dicer1e jest wynikiem ekspresji konstrukcji genowej *Dicer1e::3xFlag* w komórkach, przeprowadzono także analizy z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-Flag Tag (D6W5B) Rabbit mAb (rozdział Materiały 3.8). Jako kontrolę izolacji, dla frakcji jądrowej zastosowano przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciwko białku jądrowemu Laminina B1 (ab16048) (rozdział Materiały 3.8). Przykładową analizę Western blotting białek przedstawiono na Rysunku 28.



Rysunek 28. Detekcja białek: wt hDicer oraz wariantu Dicer1e w komórkach metodą Western blotting. (Kontrola) komórki HEK293T lub HEK293T No_Dice typu dzikiego; (+Dicer): komórki po transfekcji konstrukcją niosącą sekwencję kodującą wt hDicer; (+Dicer1e): komórki po transfekcji konstrukcją niosącą sekwencję kodującą Dicer1e. (T) lizat komórkowy zawierający frakcję białek cytoplazmatycznych i jądrowych; (C) frakcja białek cytoplazmatycznych; (N) frakcja białek jądrowych. Niebieskimi strzałkami zaznaczono sygnał pochodzący od wt hDicer. Czerwonymi strzałkami zaznaczono sygnał pochodzący od białka Dicer1e. Czarnymi strzałkami zaznaczono sygnał pochodzący od niezdefiniowanych izoform hDicer.

Podobnie jak w przypadku analiz, których wyniki zaprezentowano na Rysunku 26, otrzymane wyniki dla analiz Western blotting z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-Dicer wykazały obecność białka wt hDicer (Rysunek 28, sygnał zaznaczony niebieskimi strzałkami) oraz jego skróconych form (Rysunek 28, sygnał zaznaczony czarnymi strzałkami). Ponadto zauważono, że jedynie w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice transfekowanych pDNA z sekwencją kodującą Dicer1e powstaje produkt białkowy odpowiadający hipotetycznemu wariantowi Dicer1e (Rysunek 28, sygnał zaznaczony czerwonymi strzałkami). Wariant ten był obecny w lizacie komórkowym, we frakcji białek cytoplazmatycznych oraz, w niewielkiej ilości, we frakcji białek jądrowych. Co więcej, w danej linii komórkowej poziom hipotetycznego białka Dicer1e był podobny pomiędzy 48 a 72 godziną od momentu transfekcji. Sygnału pochodzącego od hipotetycznego wariantu Dicer1e nie zaobserwowano w pozostałych układach badawczych, tzn. w komórkach nietransfekowanych oraz w komórkach po transfekcji pDNA z sekwencją kodującą wt hDicer. W przypadku analiz Western blotting z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-Flag Tag zaobserwowano sygnały pochodzące od wt hDicer oraz Dicer1e w komórkach po transfekcji pDNA niosącym sekwencję kodującą wt hDicer lub Dicer1e w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag. Obserwowana skrócona forma hDicer w lizacie zawierającym frakcję białek cytoplazmatycznych i jądrowych (ścieżka oznaczona jako T) komórek HEK293T+hDicer oraz HEK293T No_Dice+hDicer najprawdopodobniej związana jest z proteolitycznym rozpadem białka pełnej długości podczas lizy komórek. Zebrane dane wskazują, iż obserwowany sygnał dla hipotetycznego białka Dicer1e, w przypadku analiz prowadzonych z wykorzystaniem przeciwciał anti-Dicer (Rysunek 28, sygnał zaznaczony czerwonymi strzałkami), z dużym prawdopodobieństwem pochodził od formy Dicer1e.

Ponieważ w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice jest obecny transkrypt *Dicer1e* (Rysunek 25), otrzymane wyniki analiz Western blotting sugerują, iż endogenny poziom białka Dicer1e w analizowanych liniach komórkowych jest bardzo niski, poniżej poziomu detekcji z wykorzystaniem zastosowanej metody, lub białko to nie powstaje. Co ciekawe, we wszystkich zastosowanych modelach badawczych, tj.: w komórkach HEK293T: (i) typu dzikiego, (ii) transfekowanych *hDicer::3xFlag*, (iii) transfekowanych *Dicer1e::3xFlag* oraz w komórkach HEK293T No_Dice: (i) nietransfekowanych, (ii) transfekowanych *hDicer::3xFlag* oraz (iii) transfekowanych *Dicer1e::3xFlag* zaobserwowano sygnał pochodzący od białek o masie ~135 i ~110 kDa, które są zlokalizowane w jądrze komórkowym. Masę białek oszacowano na podstawie rozdziału

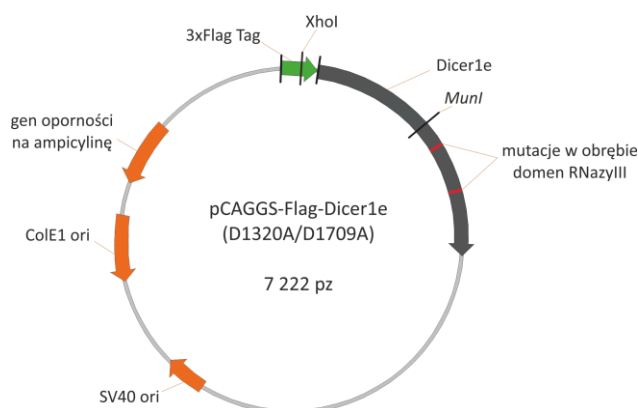
markera wielkości (dane niepokazane). Pod względem masy molekularnej, białka te nie przypominają żadnej z wcześniej opisanych skróconych form hDicer (Tabela 5.1 i 5.2). Warto w tym miejscu przypomnieć, iż użyte przeciwciała pierwszorzędowe anty-Dicer specyficznie rozpoznają i wiążą się do sekwencji aminowkasowej hDicer pomiędzy 1701 a 1912 aminokwasem, w rejonie domen RNazowych. Na tej podstawie można przypuszczać, iż wykryte warianty muszą zawierać domeny RNazowe hDicer. Zebrane wyniki mogą wskazywać na obecność dwóch endogennych skróconych wariantów hDicer występujących w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice.

5.2.2 Badanie aktywności RNazowej wariantu Dicer1e w warunkach *in vitro*

Z danych literaturowych wiadomo, że wariant Dicer1e jest obecny zarówno w komórkach zdrowych, jak i nowotworowych oraz ulega lokalizacji głównie w obrębie jądra komórkowego [124, 125]. Wariant Dicer1e posiada unikatowy koniec N, obie domeny RNazy III (IIIa i IIIb) oraz domenę dsRBD. Obecność domen RNazowych wskazuje, iż wariant ten może hydrolizować substraty RNA. Aktywność nukleazowa wariantu Dicer1e nie została jednakże do tej pory opisana. Biorąc pod uwagę powyższe okoliczności postanowiono zbadać potencjalną aktywność nukleazową wariantu Dicer1e, zarówno wobec substratów RNA, jak i DNA. W tym celu przygotowano preparat białkowy wariantu Dicer1e. Szczegółowy opis przygotowania konstrukcji genowej niosącej sekwencję kodującą wariant Dicer1e został opisany w rozdziale Metody 4.1.2. Dodatkowo, jako kontrole, przygotowano: (i) wariant Dicer1e posiadający mutacje w obu domenach RNazowych znoszące aktywność hydrolityczną tych domen (nazwany: Dicer1e (D1320A/D1709A)) oraz (ii) wariant przypominający formę Dicer1e ze względu na obecność obu domen RNazowych oraz domeny dsRBD, jednakże różniący się pierwszymi 13 aa w części N-końcowej (nazwany Δ Helikaza-PAZ). Należy zaznaczyć, iż wariant delecyjny Δ Helikaza-PAZ został uprzednio przygotowany i scharakteryzowany pod względem aktywności RNazowej przez grupę prof. Narry Kim, a konstrukcja genowa pozwalająca na uzyskanie wariantu Δ Helikaza-PAZ jest komercyjnie dostępna [131]. Opublikowane dane dotyczące aktywności RNazowej wariantu Δ Helikaza-PAZ, z wykorzystaniem substatu pre-miRNA 30a, wskazują, iż wariant ten nie posiadał zdolności do generowania produktu o długości miRNA [131].

W celu uzyskania konstrukcji genowej niosącej sekwencję kodującą Dicer1e z mutacją w domenach RNazy III (*pCAGGS-Flag-Dicer1e (D1320A/D1709A)*) wykorzystano komercyjnie dostępną konstrukcję genową niosącą sekwencję kodującą hDicer z mutacją

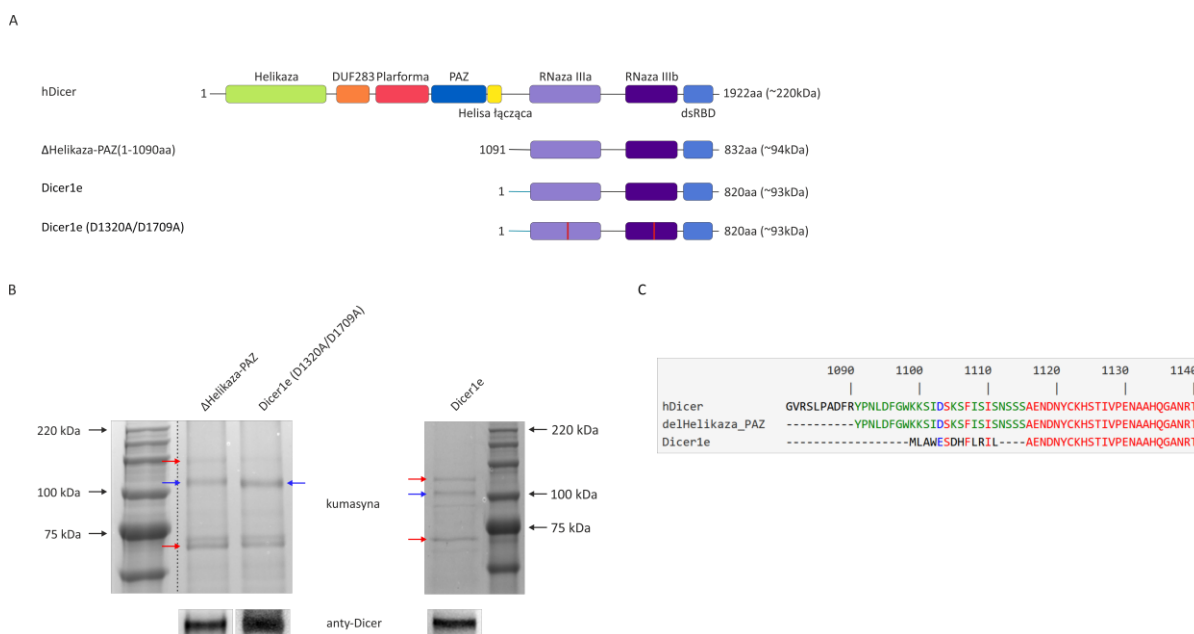
(substytucją) D1320A, w obrębie domeny RNazy IIIa oraz substytucją D1709A, w obrębie domeny RNazy IIIb (rozdział Materiały 3.4). Szczegółowy opis przygotowania konstrukcji genowej opisano w rozdziale Metody 4.1.3. W rezultacie otrzymano wektor niosący sekwencję kodującą Dicer1e, posiadającą mutację w obrębie domeny RNazy IIIa w pozycji D1320A oraz domeny RNazy IIIb w pozycji D1709A, w fuzji z sekwencją kodującą znacznik 3x Flag Tag na końcu 5' (Rysunek 29). Przygotowanym wektorem transformowano bakterie *E. coli*. Obecność zrekombinowanego wektora (zawierającego pożądaną wstawkę) potwierdzono z wykorzystaniem kolonijnej reakcji PCR, z użyciem starterów specyficznych dla sekwencji *DICER1* (rozdział Metody 4.1.4). Z wybranych, na podstawie kolonijnej reakcji PCR, pozytywnych klonów bakteryjnych wyizolowano pDNA. Otrzymany pDNA został wykorzystany jako matryca w reakcji sekwencjonowania metodą Sanger, w celu sprawdzenia zgodności sekwencji insertu z sekwencją referencyjną, a także poprawności zachowania ramki odczytu względem kodonu start oraz sekwencji kodującej znacznik 3x Flag Tag.



Rysunek 29. Uproszczony schemat budowy wektora pCAGGS wraz z wprowadzoną sekwencją kodującą Dicer1e z mutacją w domenach RNazowych, w fuzji ze znacznikiem 3x Flag Tag na końcu N.

Następnie otrzymane konstrukcje genowe: (i) *Dicer1e::3xFlag*, (ii) *pCAGGS-Flag-Dicer1e (D1320A/D1709A)* oraz (iii) *pcDNA3.1-FLAG-Dicer-ΔPAZ* zostały wykorzystane do transfekcji komórek HEK293T No_Dice. Komórki zebrano po 48 godzinach od transfekcji. Otrzymane osady komórkowe poddano lizie w buforze Prot S-100 celem uwolnienia frakcji cytoplazmatycznej, a następnie zwirowano (rozdział Metody 4.2.4). Otrzymany supernatant inkubowano ze złożem agarozowym ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel opłaszczonym

przeciwciałem anty-Flag Tag, celem immunoprecypitacji białka. Elucję związanego ze złożem białka przeprowadzono z wykorzystaniem peptydu 3x Flag (rozdział Metody 4.3.1). Otrzymane preparaty białkowe poddano analizie jakościowej i ilościowej poprzez przeprowadzenie rozdzielania elektroforetycznego białek w 8% żelu PAA w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (rozdział Metody 4.3.2). Do określenia stężenia białka wykorzystano rozcieńczenia BSA o znanym stężeniu. Reprezentatywne próbki preparatów białkowych przedstawiono na Rysunku 30. Dodatkowo, obecność wariantów: Dicer1e, Dicer1e (D1320A/D1709A) oraz Δ Helikaza-PAZ w uzyskanych preparatach białkowych potwierdzono metodą Western blotting wykorzystując przeciwciała pierwszorzędowe anti-Dicer (F-10): sc-136979 (rozdział Materiały 3.8). Przykładowa analiza Western blotting preparatów białkowych została przedstawiona na Rysunku 30.



Rysunek 30. Schematyczne przedstawienie budowy hDicer oraz wariantów: Dicer1e, Dicer1e (D1320A/D1709A) oraz Δ Helikaza-PAZ (A). Czerwonymi liniami zaznaczono orientacyjne miejsca wprowadzonych mutacji w obrębie domen RNazowych. Analiza preparatów białkowych: Dicer1e, Dicer1e (D1320A/D1709A) oraz Δ Helikaza-PAZ w denaturującym żelu PAA wybarwionym kumasyną (panel górny) oraz analiza Western blotting z przeciwciałami anti-Dicer (panel dolny) (B). Czerwonymi strzałkami zaznaczono białka współcyszczające się z preparatami hDicer. Niebieskimi strzałkami zaznaczono badane białko. Porównanie N-końcowej sekwencji aminokwasowej wariantu Dicer1e oraz Δ Helikaza-PAZ (C).

Na podstawie rozdzielania elektroforetycznego otrzymanych preparatów białkowych w żelu PAA zaobserwowano obecność tych samych współcyszczających się białek: ANM5

i KIF11, jak w przypadku preparatów białkowych: wt hDicer, Δ Helikaza, Helikaza-DUF283, DUF283(Δ DUF283(630-709aa) oraz Δ DUF283(625-752aa) (Rysunek 18B).

Preparat Dicer1e badano pod kątem aktywności RNazowej z wykorzystaniem substratów: pre-miRNA 16-1 oraz dwóch dupleksów RNA o długości 30 pz: (i) dupleksu z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcach 3' (dsRNA_ov) oraz (ii) dupleksu z tępo zakończonymi końcami (dsRNA_bl). Reakcje cięcia zawierały 12,5 nM białka Dicer1e oraz ~5 nM: pre-miRNA 16-1 znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' lub dsRNA (dsRNA_ov lub dsRNA_bl), w którym jedna z dwóch nici była znakowana izotopem ^{32}P na końcu 5'. Jako kontrolę przygotowano dwie reakcje bez białka: jedną zawierającą sam substrat w buforze reakcyjnym (K-), drugą zawierającą substrat w buforze reakcyjnym z dodatkiem 25 mM EDTA (K+EDTA). Kontrole te pozwalały na monitorowanie integralności substratu w trakcie inkubacji w samym buforze reakcyjnym. Dodatkowo, przygotowano reakcję kontrolną zawierającą substrat, 12,5 nM białka i 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). Kolejne reakcje kontrolne zostały przygotowane z białkami: wt hDicer, Δ Helikaza-PAZ oraz Dicer1e (D1320A/D1709A). Reakcje te zostały przygotowane według schematu opisanego powyżej. Mieszaniny reakcyjne inkubowano przez: 15 minut, 30 minut i 60 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 15% denaturującym żelu PAA i uwidocznilo za pomocą obrazowania fosforowego (rozdział Metody 4.1.6) (Rysunek 31). W celu określenia długości generowanych produktów cięcia zastosowano marker długości w postaci produktów alkalicznej hydrolizy substratu ssRNA32.

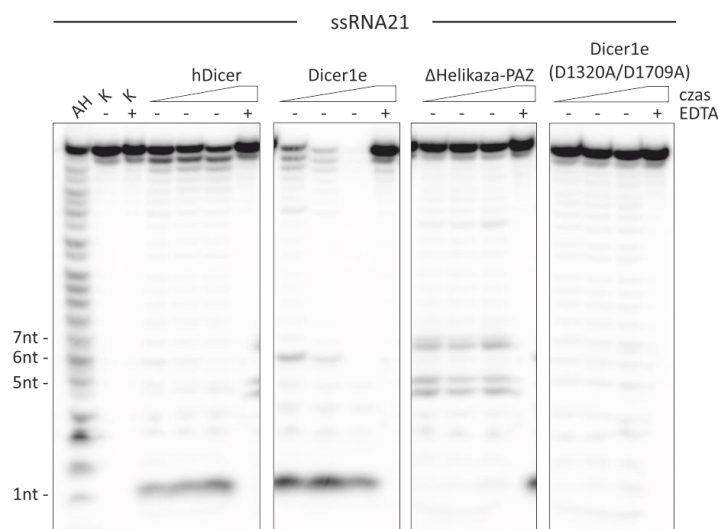
Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, iż w reakcjach z substratem pre-miRNA 16-1, Dicer1e generowała produkty o długości ~30, ~23, ~14 i ~10 nt. Cięcie substratu było znacznie mniej wydajne w reakcji kontrolnej zawierającej Dicer1e i EDTA (Rysunek 31A). W przypadku reakcji z wt hDicer zaobserwowano wydajne generowanie produktu cięcia o długości mikroRNA (~21 nt). W reakcjach z wariantem Δ Helikaza-PAZ zaobserwowano produkty RNA o długości ~27, ~21 i ~9 nt, jednakże produkty te były generowane na bardzo niskim poziomie (Rysunek 31A). Specyficznych produktów hydrolizy RNA nie zaobserwowano w reakcjach prowadzonych z preparatem Dicer1e (D1320A/D1709A), jednakże w reakcjach tych zaobserwowano nieznaczną fragmentację substratu, co wskazuje na jego nieenzymatyczną hydrolizę zależną od obecności jonów Mg^{2+} (zanik po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej EDTA).

hDicer powstawały specyficzne produkty o długości miRNA (~21 nt) oraz produkty o długości ~12 i ~11 nt (Rysunek 31B). Produktów specyficznej hydrolizy RNA nie zaobserwowano w reakcjach prowadzonych z białkami Δ Helikaza-PAZ oraz Dicer1e (D1320A/D1709A).

W reakcjach prowadzonych z udziałem substratu dsRNA_{bl} oraz preparatu Dicer1e zaobserwowano niewielkie ilości produktów o długości ~8 nt (Rysunek 31C). W przypadku reakcji z preparatem wt hDicer zaobserwowano generowanie produktów cięcia o długości ~21, ~12 i ~11 nt, jednakże produkty te powstawały mniej wydajnie w porównaniu z wydajnością wytwarzania produktów o tej samej długości w reakcji z substratem dsRNA_{ov} (Rysunek 31B). Ponownie w reakcjach prowadzonych z preparatami Δ Helikaza-PAZ oraz Dicer1e (D1320A/D1709A) nie zaobserwowano specyficznych produktów cięcia.

Zgromadzone wyniki ujawniły, iż wariant Dicer1e oraz wariant Δ Helikaza-PAZ, pomimo podobieństwa strukturalnego (Rysunek 30A), charakteryzowały się różną aktywnością RNazową względem testowanych substratów. Niemniej jednak, żaden ze wspomnianych wariantów nie generował produktów długości miRNA/siRNA. Wyniki te są spójne z wynikami badań aktywności RNazowej dla wariantu Δ Helikaza-PAZ opublikowanymi przez zespół prof. Narry Kim [131].

Następnie sprawdzono, czy Dicer1e może hydrolizować substraty typu miRNA. W badaniach tych zastosowano cząsteczkę ssRNA21. Reakcje cięcia prowadzono z wykorzystaniem 12,5 nM preparatu Dicer1e oraz ~5 nM ssRNA21 znakowanego izotopem ³²P na końcu 5'. Przygotowano również reakcje kontrolne z białkami: wt hDicer, Δ Helikaza-PAZ oraz Dicer1e (D1320A/D1709A). Mieszaniny reakcyjne inkubowano przez: 15 minut, 30 minut i 60 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddano rozdzielni elektroforetycznej w 15% denaturującym żelu PAA i uwidoczniono za pomocą obrazowania fosforowego (rozdział Metody 4.1.6) (Rysunek 32). W celu oszacowania długości generowanych produktów cięcia zastosowano marker długości w postaci produktów alkalicznej hydrolizy substratu ssRNA21.



Rysunek 32. Badanie aktywności RNazowej preparatu Dicer1e względem substratu typu miRNA. Reakcje cięcia przeprowadzono ze znakowanym izotopem ^{32}P na końcu 5' substratem ssRNA21 oraz 12,5 nM białka. Trójkątami oznaczono wzrastający czas inkubacji wynoszący odpowiednio: 15 minut, 30 minut i 60 minut. (K-) substrat inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka; (K+EDTA) substrat inkubowany w buforze reakcyjnym bez białka, z dodatkiem 25 mM EDTA; (+EDTA) uzupełnienie buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. (AH) produkt alkalicznej hydrolizy substratu ssRNA21. Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA.

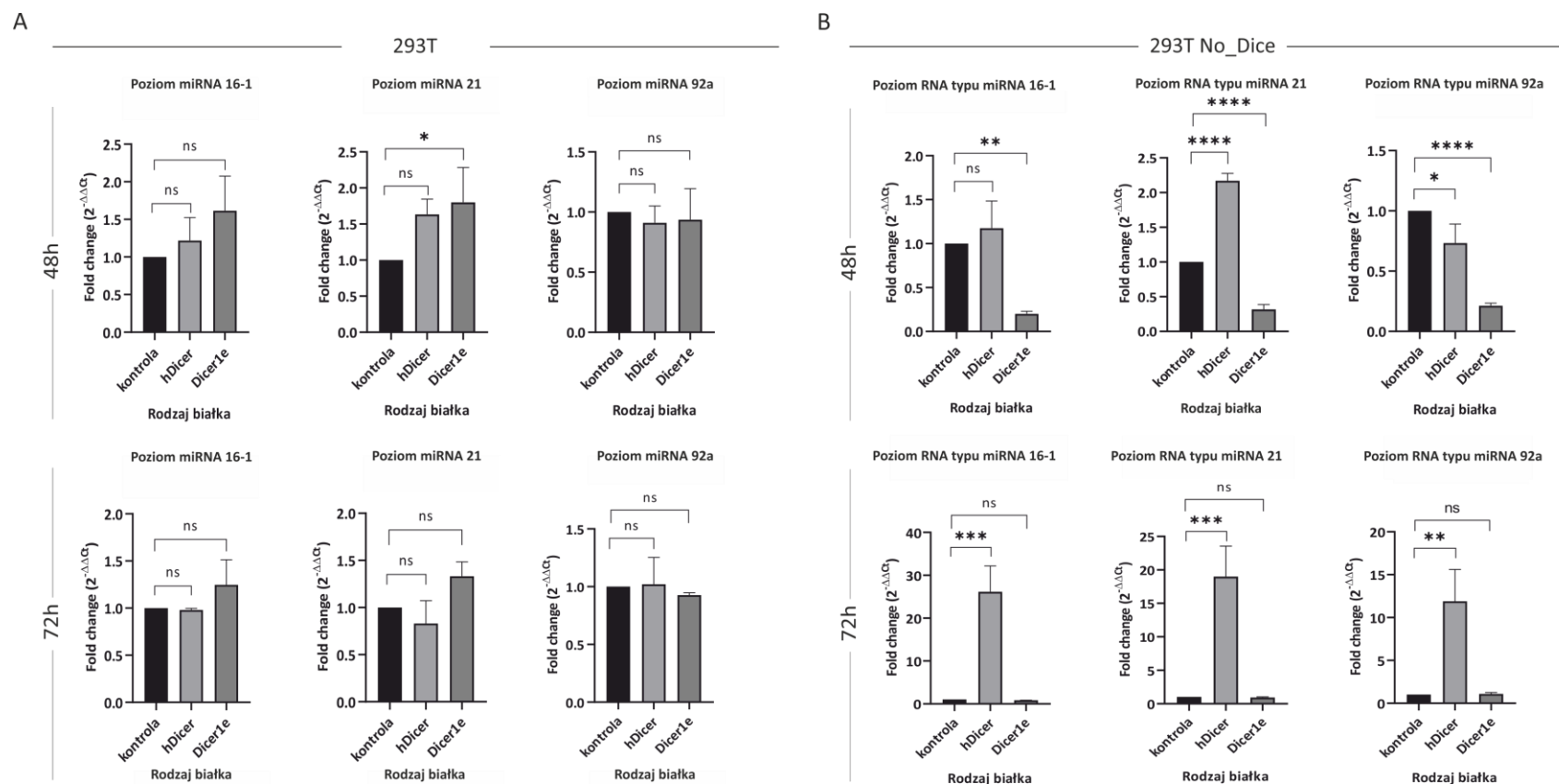
W przypadku reakcji prowadzonych z Dicer1e obserwowano stopniowy zanik substratu w czasie prowadzenia reakcji. Ponadto, po pierwszych 15 minutach inkubacji zaobserwowano produkty RNA o długości ~ 6 i $\sim 1/2$ nt. Wraz z czasem inkubacji zaobserwowano zanikanie produktu o długości ~ 6 nt (Rysunek 32). W reakcjach prowadzonych z hDicer zaobserwowano produkty RNA o długości $\sim 1/2$ nt. W reakcjach z udziałem preparatu Δ Helikaza-PAZ zaobserwowano produkty RNA o długości ~ 7 i ~ 5 nt (Rysunek 32). W reakcjach prowadzonych z białkiem Dicer1e (D1320A/D1709A) nie zaobserwowano specyficznych produktów hydrolizy RNA.

Należy zaznaczyć, iż docinanie substratów o długości miRNA/siRNA i generowanie produktów cięcia o długości $\sim 1/2$ nt było uprzednio obserwowane także dla wariantów Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 14).

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że wariant Dicer1e mógłby uczestniczyć w procesie degradacji krótkich komórkowych RNA.

5.2.3 Analiza poziomu wybranych krótkich RNA w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice produkujących wariant Dicer1e

Biorąc pod uwagę wyniki badań *in vitro*, sugerujące iż Dicer1e może hydrolizować (docinać) cząsteczki o długości miRNA, w kolejnym kroku postanowiono sprawdzić, czy wariant Dicer1e może wpływać na poziom krótkich RNA generowanych w komórce. W celu sprawdzenia, czy wariant Dicer1e może wpływać na wydajność generowania krótkich RNA (typu miRNA) w komórkach, wykorzystano reakcję qPCR. Materiał do badań stanowiły komórki HEK293T oraz HEK293T No_Dice. Należy zaznaczyć, iż pomimo braku endogennej hDicer, w liniach HEK293T No_Dice powstają krótkie RNA zawierające sekwencje miRNA, jednakże cząsteczek tych nie można zakwalifikować do typowych miRNA, tj. produktów specyficznej hydrolizy Dicer [67]. Jak ustalono, w komórkach HEK293T No_Dice długość krótkich RNA zawierających sekwencję miRNA mieści się w przedziale od 16 do 26 nt [67]. Komórki HEK293T oraz HEK293T No_Dice transfekowane były konstrukcją genową: (i) *hDicer::3xFlag* lub (ii) *Dicer1e::3xFlag*. Osad komórkowy zebrano po upływie 48 i 72 godzin od transfekcji, a następnie z zebranych osadów wyizolowano frakcję całkowitego RNA przy użyciu odczynnika TRIzol (rozdział Metody 4.1.13). Na matrycy cDNA uzyskanego w wyniku odwrotnej transkrypcji RNA wyizolowanego z wyżej wymienionych komórek zostały przeprowadzone analizy qPCR z udziałem starterów specyficznych dla wybranych miRNA: miRNA 16-1, miRNA 21 oraz miRNA 92a (Rysunek 33). Wybrane miRNA są wydajnie produkowane w komórkach HEK293T. Kontrolę w reakcjach stanowił całkowity RNA wyizolowany z komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice traktowanych odczynnikami do transfekcji (rozdział Metody 4.2.3).



Rysunek 33. Ilościowa analiza zmian poziomu wybranych miRNA oraz RNA typu miRNA w komórkach HEK 293T oraz HEK 293T NoDice transfekowanych konstrukcją genową *hDicer::3xFlag Tag* lub *Dicer1e::3xFlag Tag* po 48 i 72 godzinach od transfekcji. Analiza RT-qPCR względnego poziomu dojrzałych cząsteczek: miRNA 16-1, miRNA 21 oraz miRNA 92a w komórkach HEK293T (A) oraz poziomu RNA typu: miRNA 16-1, miRNA 21 oraz miRNA 92a w komórkach 293T No_Dice (B). Poziomy miRNA normalizowano względem poziomu genu referencyjnego U6. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe (\pm SD) dla trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. W celu porównania średnich kontrolnych oraz badanych zastosowano jednokierunkowy test ANNOVA, a następnie test wielokrotnych porównań Dunetta (dla 48h: **** $p < 0,0001$, ** $p < 0,027$, * $p < 0,0208$; dla 72h: *** $p < 0,0002$, ** $p < 0,0014$).

Na podstawie przeprowadzonej analizy ilościowej dla komórek HEK293T po 48 i 72 godzinach od transfekcji nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w poziomie wybranych miRNA pomiędzy komórkami stanowiącymi kontrolę a komórkami po transfekcji konstrukcją genową *hDicer::3xFlag Tag* lub *Dicer1e::3xFlag Tag*. W przypadku komórek HEK293T No_Dice, transfekowanych *hDicer::3xFlag Tag* (tzw. *rescue control*), po 48 godzinach od transfekcji zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost poziomu sygnału dla miRNA 21, w porównaniu do komórek kontrolnych. Po 72 godzinach zaobserwowano kilkunastokrotny wzrost poziomu sygnału dla wszystkich badanych miRNA w porównaniu do komórek kontrolnych, co najprawdopodobniej było związane z przywróceniem aktywności hDicer w komórkach HEK293T No_Dice. W przypadku komórek HEK293T No_Dice transfekowanych konstrukcją kodującą wariant Dicer1e, po 48 godzinach od transfekcji zaobserwowano około czterokrotny spadek poziomu sygnału dla testowanych krótkich RNA, zawierających sekwencję badanych miRNA, w porównaniu do komórek kontrolnych. Co ciekawe, po 72 godzinach od transfekcji nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w poziomie sygnału dla krótkich RNA zawierających sekwencję badanych miRNA w porównaniu do komórek kontrolnych. Co ważne, na podstawie analiz poziomu efektywności produkcji białka Dicer1e w komórkach HEK293T No_Dice w czasie, nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie tego białka pomiędzy 48 a 72 godziną od transfekcji wektorem *Dicer1e::3xFlag* (Rysunek 28).

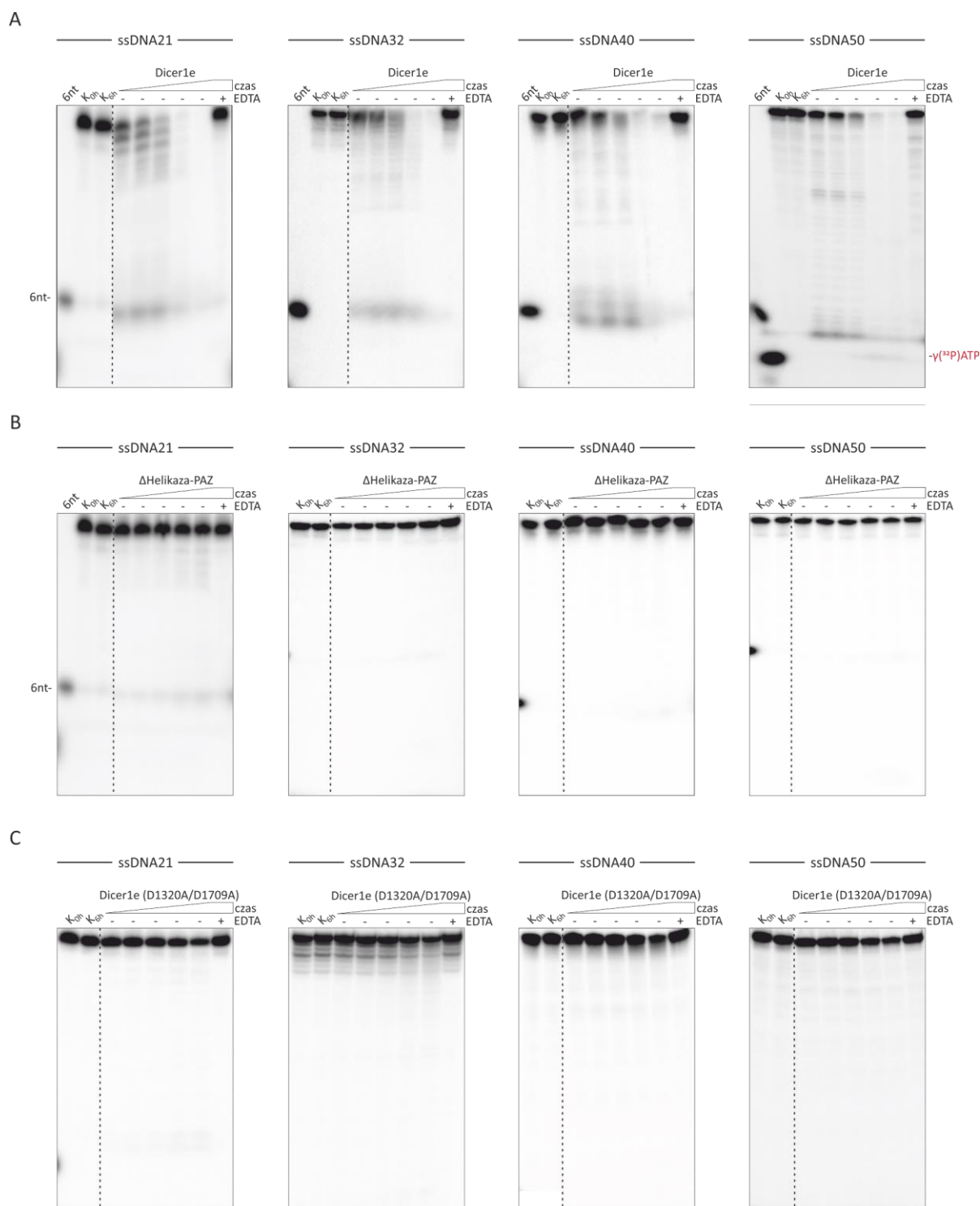
Podsumowując, przeprowadzone analizy *in vitro* (Rysunek 31 i 32) oraz *in cellulo* (Rysunek 33) sugerują, iż białko Dicer1e mogłoby być zaangażowane w metabolizm komórkowych RNA poprzez degradację krótkich cząsteczek RNA. Obserwowany brak wpływu Dicer1e na poziom generowanych miRNA w komórkach posiadających endogenną hDicer (Rysunek 33) może wskazywać, iż w warunkach fizjologicznych hDicer, poprzez swoją aktywność, rekompensuje ubytek miRNA wynikający z aktywności Dicer1e, bądź też hDicer i Dicer1e konkurują o dostępność do substratu. W przypadku komórek nowotworowych, kiedy dochodzi do nadprodukcji wariantu Dicer1e, poziom miRNA mógłby jednak zostać zaburzony.

5.2.4 Badanie aktywności DNazowej wariantu Dicer1e w warunkach *in vitro*

W kolejnym etapie pracy badano, czy Dicer1e wykazuje aktywność DNazową. W reakcjach cięcia wykorzystano ssDNA o długości 21, 32, 40 i 50 nt. Podobnie jak w przypadku poprzednich analiz (Rysunek 31 i 32), reakcje kontrolne przeprowadzono

z wykorzystaniem preparatów: Δ Helikaza-PAZ oraz Dicer1e (D1320A/D1709A). Mieszaniny reakcyjne zawierały 12,5 nM białka oraz ~5 nM znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' substratu ssDNA. Mieszaniny reakcyjne inkubowano przez: 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godziny, 6 godzin w temperaturze 37 °C. Przygotowano również dwie kolejne reakcje kontrolne: kontrolę zawierającą substrat w buforze reakcyjnym w czasie 0 (K_{0h}) oraz kontrolę zawierającą substrat w buforze reakcyjnym, inkubowaną przez 6 godzin w 37 °C (K_{6h}). Kontrole te pozwalały na monitorowanie integralności substratu w trakcie inkubacji w samym buforze reakcyjnym. Dodatkowo przygotowano reakcję kontrolną zawierającą substrat, 12,5 nM białka i 25 mM EDTA w buforze reakcyjnym (+EDTA). Reakcje poddano rozdzielni elektroforetycznemu w 15% denaturującym żelu PAA i uwidoczniono za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 34).

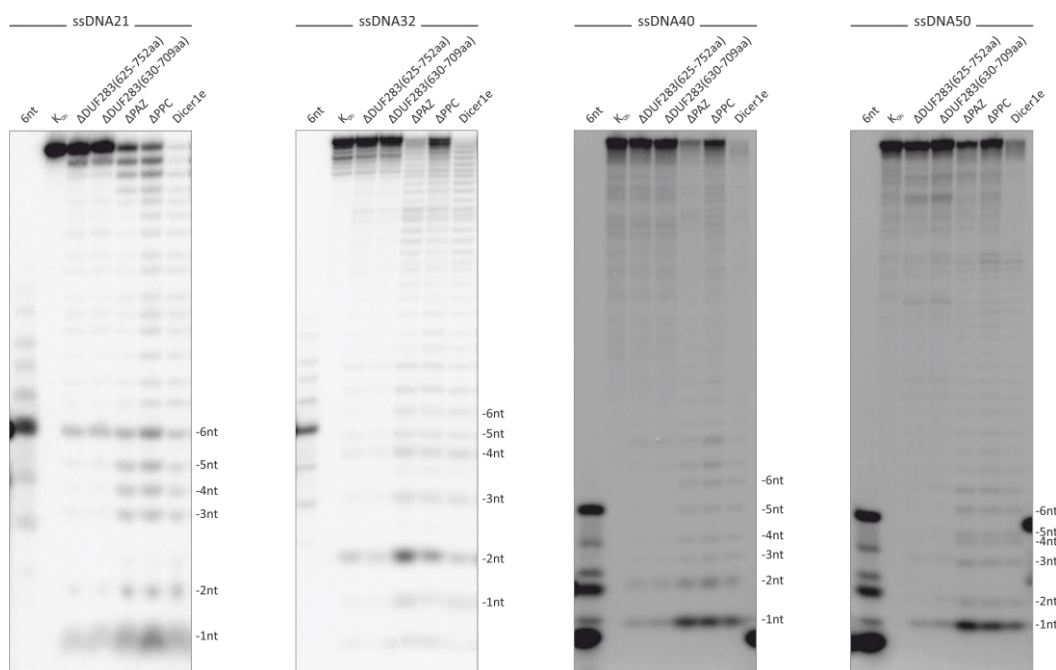
Na podstawie zebranych wyników zaobserwowano, iż wariant Dicer1e wykazywał aktywność hydrolizy ssDNA wobec wszystkich testowanych substratów. W zastosowanych warunkach reakcyjnych, wariant Dicer1e generował szereg produktów DNA niezależnie od długości substratu ssDNA. Produkty te były zauważalne już po 15 minutach reakcji. Po upływie 3 godzin od rozpoczęcia inkubacji substratu z białkiem zaobserwowano niemalże całkowity zanik substratu. Produktów hydrolizy DNA nie zaobserwowano w reakcjach kontrolnych, również w kontroli z białkiem, z dodatkiem 25 mM EDTA (Rysunek 34A). W reakcjach prowadzonych z preparatem Δ Helikaza-PAZ oraz Dicer1e (D1320A/D1709A) nie zaobserwowano specyficznych produktów cięcia substratów ssDNA (Rysunek 34B i C).



Rysunek 34. Badanie aktywności DNazowej preparatów białkowych: Dicer1e, Δ Helikaza-PAZ, oraz Dicer1e (D1320A/D1709A) względem jednoniciowych substratów DNA. Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem jednoniciowych znakowanych izotopem ^{32}P na końcu 5' substratów DNA: ssDNA21, ssDNA32, ssDNA40, ssDNA50 oraz 12,5 nM preparatu: Dicer1e (A), Δ Helikaza-PAZ (B) i Dicer1e (D1320A/D1709A) (C). Trójkątami oznaczono wzrastający czas inkubacji, który wynosił odpowiednio: 15 minut, 30 minut, 60 minut, 3 godzin, 6 godzin. (K_{0h}) substat w buforze reakcyjnym bez białka w czasie 0; (K_{6h}) substat w buforze reakcyjnym bez białka inkubowany przez 6 godzin; (+EDTA) uzupełnienie

buforu reakcyjnego 25 mM EDTA. Marker wielkości (6nt) ssDNA o długości 6 nt. (γ (32 P)ATP) izotop. Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA.

W celu uzyskania lepszej rozdzielczości sygnałów pochodzących od produktów generowanych przez wariant Dicer1e, mieszaniny reakcyjne analizowano także w 20% denaturującym żelu PAA. Mieszaniny reakcyjne zostały przygotowane zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale Wyniki 5.1.2 dotyczącym reakcji cięcia z wariantami Δ DUF(625-752aa), Δ DUF(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC. Reakcje inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C, a następnie poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 20% denaturującym żelu PAA i uwidocznilo za pomocą obrazowania fosforowego (Rysunek 35). Do określenia długości generowanych produktów cięcia zastosowano marker długości w postaci jednoniciowej cząsteczki DNA o długości 6 nt.



Rysunek 35. Aktywność DNazowa wariantu Dicer1e. Reakcje cięcia przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanych izotopem 32 P na końcu 5' substratów ssDNA o długości: 21 nt, 32 nt, 40 nt i 50 nt. Reakcje przeprowadzono w obecności 12,5 nM białka w mieszaninie reakcyjnej. (K_{oh}) substrat w buforze reakcyjnym bez białka w czasie 0. (6nt) jednoniciowa cząsteczka DNA o długości 6 nt. Rozdział prowadzono w 20% denaturującym żelu PAA. Fragmenty rysunku zostały uprzednio wykorzystane do zaprezentowania aktywności DNazowej wariantów hDicer pozbawionych domeny DUF283 (Rysunek 21) i domeny PAZ (Rysunek 15).

Na podstawie zebranych wyników zaobserwowano, iż w zależności od długości cząsteczki DNA, wariant *Dicer1e* generował produkty cięcia o długości w zakresie: od 20 do 1 nt dla ssDNA21; od 31 do 1 nt dla ssDNA32; od 39 do 1 nt dla ssDNA40; od 49 do 1 nt dla ssDNA50. Porównując do wcześniejszych eksperymentów, podobne wzory cięcia odpowiednich substratów były obserwowane w przypadku reakcji prowadzonych z udziałem wariantów: Δ DUF(630-709aa), Δ DUF(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC, jednakże w przypadku wariantów Δ DUF(630-709aa), Δ DUF(625-752aa) i Δ PPC wydajność cięcia substratów była niższa, w porównaniu z wydajnością cięcia takich samych substratów przez warianty *Dicer1e* oraz Δ PAZ. Biorąc pod uwagę fakt, że wykorzystane w reakcjach substraty ssDNA były znakowane izotopem ^{32}P na końcu 5', zgromadzone dane sugerują, iż warianty pozbawione domeny DUF283, warianty pozbawione domeny PAZ lub kasety PPC oraz wariant *Dicer1e* mogą posiadać aktywność egzonukleazową 3'→5'. Ze względu na fakt, iż nie udało się uzyskać homogennych preparatów białkowych dla wszystkich testowanych wariantów h*Dicer* (Rysunek 18B i 30B), nie można w pełni wykluczyć, iż obserwowana aktywność egzonukleazowa 3'→5' może wynikać z aktywności hydrolitycznej współocyszczających się białek. Niemniej jednak, warianty: Δ Helikaza, Δ Helikaza-DUF, Δ Helikaza-PAZ, a także wariant *Dicer1e* (D1320A/D1709A) nie wykazywały aktywności DNazowej względem testowanych cząsteczek ssDNA, pomimo iż preparaty te również zawierały ten sam zestaw współocyszczających się białek (Rysunek 18B i 30B). Należy przypomnieć, że warianty *Dicer1e* i Δ Helikaza-PAZ różnią się zaledwie 13 aminokwasami na ich końcach N (Rysunek 30C). Różnica w sekwencji aminokwasowej N końca analizowanych białek najprawdopodobniej wpływa na dostępność domen RNazowych dla substratu ssDNA.

5.2.5 Porównanie profilu ekspresji genów w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice produkujących wariant *Dicer1e*

Biorąc pod uwagę dane literaturowe wskazujące, iż ekspresja *Dicer1e* w komórkach nowotworowych jest wyższa w porównaniu do komórek zdrowych (prawidłowych) [125], w kolejnym etapie badań sprawdzono, jak nadprodukcja formy *Dicer1e* w komórkach HEK293T wpływa na profil ekspresji genów. W tym celu przeprowadzono sekwencjonowanie NGS puli całkowitego RNA przy pomocy technologii MGI DNBSegTM oferowanej przez firmę BGI. Szczegółowy opis technologii MGI DNBSeg opisano w rozdziale Metody 4.4. Materiał do badań stanowiły komórki HEK293T oraz HEK293T No_Dice, w dwóch układach: (i) komórki traktowane odczynnikami do transfekcji (tzw. typu dzikiego, wt) oraz (ii) komórki transfekowane wektorem niosącym sekwencję kodującą wariant *Dicer1e* (*Dicer1e::3xFlag*).

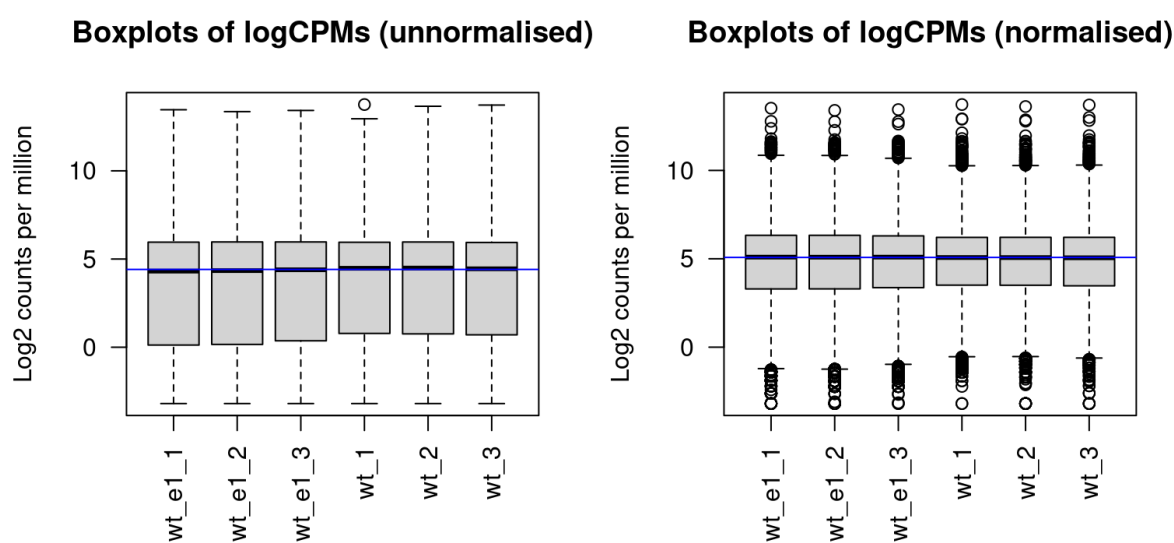
Przygotowano trzy niezależne powtórzenia biologiczne dla każdego układu. Osady komórkowe zostały zebrane po 48 godzinach od transfekcji lub potraktowaniu odczynnikiem do transfekcji (rozdział Metody 4.2.3). Następnie, z otrzymanych osadów komórkowych został wyizolowany całkowity RNA przy użyciu odczynnika TRIzol (rozdział Metody 4.1.13). Przygotowanie bibliotek cDNA oraz ich sekwencjonowanie wraz z kontrolą jakości i wstępną analizą uzyskanych danych zostały przeprowadzone przez firmę BGI. W wyniku sekwencjonowania RNA-Seq wygenerowano dla każdej z próbek średnio 51,7 milionów (mln) odczytów o długości 150 pz. Kolejnym etapem było usunięcie z uzyskanych surowych danych odczytów niskiej jakości oraz sekwencji adapterów, a także sprawdzenie jakości odczytów z wykorzystaniem współczynnika Q (ang. *Quality Score*). Wartość współczynnika Q określa prawdopodobieństwo, że wskazany (dany) nukleotyd został błędnie odczytany. Przykładowo, wartość współczynnika Q20 oznacza dokładność odczytania nukleotydów na poziomie 99%, natomiast wartość Q30 oznacza dokładność odczytania nukleotydów na poziomie 99,9% [151]. Po odrzuceniu odczytów niskiej jakości, dla każdej z próbek pozostało średnio 49,5 mln odczytów. Wszystkie etapy filtrowania zebranych danych były przeprowadzone z wykorzystaniem standardowych programów i protokołów oferowanych przez firmę BGI. Następnie, przefiltrowane odczyty zostały przyrównane (zmapowane) przy użyciu programu HISAT [135] do ludzkiego genomu referencyjnego, w wersji hg38, który został pobrany z bazy danych UCSC (University of California Santa Cruz Genome Browser). Średni współczynnik mapowania z genomem referencyjnym wynosił 96,93%. Po mapowaniu zidentyfikowano 17 504 genów. Końcowy raport ilości oraz jakości danych uzyskanych podczas sekwencjonowania przedstawiono w Tabeli 5.3.

Tabela 5.3 Podsumowanie danych uzyskanych w wyniku sekwencjonowania RNA-Seq dla próbek pochodzących z komórek HEK293T i HEK293T No_Dice.

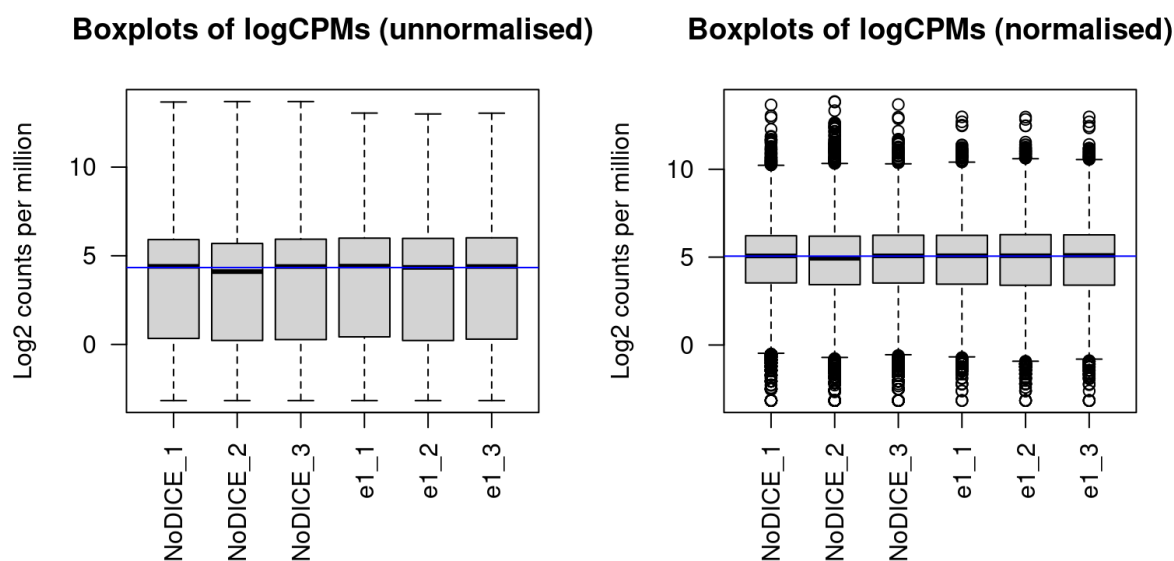
Nazwa próbki	Liczba surowych odczytów [mlm]	Liczba odczytów po filtrowaniu dla próbki [mln]	Liczba pz po filtrowaniu dla próbki [Gpz]	Ilość odczytów z jakością Q20 [%]	Ilość odczytów z jakością Q30 [%]	Całkowite zmapowanie do genomu [%]	Sekwencje zmapowane do genomu tylko jeden raz [%]
HEK293T No_Dice (1)	47,08	45,08	6,76	94,90	86,72	96,98	91,63
HEK293T No_Dice (2)	55,92	53,85	8,08	96,33	89,64	97,27	91,06
HEK293T No_Dice (3)	47,21	44,97	6,75	94,88	86,63	97,04	91,79
HEK293T No_Dice +Dicer1e (1)	54,24	51,10	7,66	97,16	91,05	96,48	90,79
HEK293T No_Dice +Dicer1e (2)	54,18	51,55	7,73	97,53	91,91	96,79	91,08
HEK293T No_Dice +Dicer1e (3)	52,43	51,03	7,65	94,47	85,63	96,81	91,60
HEK293T (1)	54,19	51,77	7,77	95,91	88,69	97,53	91,96
HEK293T (2)	44,70	41,46	6,22	94,80	86,42	97,07	92,09
HEK293T (3)	49,85	47,85	7,18	94,75	86,35	97,37	92,19
HEK293T +Dicer1e (1)	52,43	50,76	7,61	94,44	85,56	97,29	91,87
HEK293T +Dicer1e (2)	54,18	52,28	7,84	94,19	84,99	97,21	91,88
HEK293T +Dicer1e (3)	54,18	52,42	7,86	94,39	85,43	97,10	91,83

Normalizacja poziomów ekspresji genów oraz analiza różnicowa ekspresji genów w komórkach kontrolnych i transfekowanych została wykonana przy użyciu pakietu edgeR (v3.36.0) [136], we współpracy z dr. Arkadiuszem Kajdaszem z Pracowni Bioinformatyki IChB PAN w Poznaniu. Wykresy rozkładu ekspresji genów dla każdej z próbek, przed i po normalizacji, zostały przedstawione na Rysunku 36. Znormalizowany poziom ekspresji genów oszacowany został w tzw. „liczbie zliczeń na milion” (CPM, ang. *counts per milion*).

A



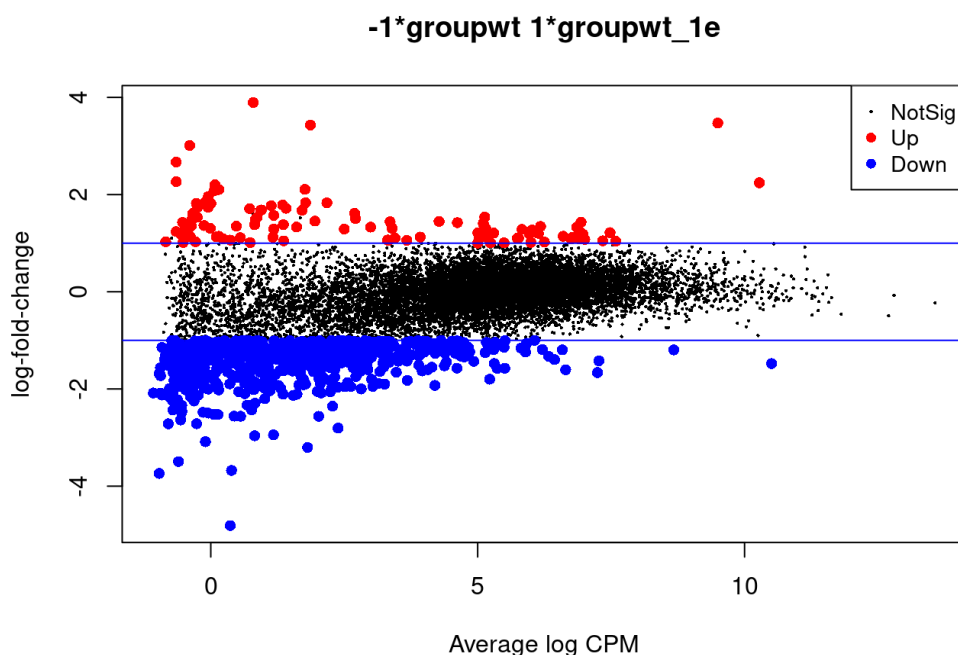
B



Rysunek 36. Wykresy pudełkowe rozkładu ekspresji genów dla każdej z próbek, przed (*unnormalised*) i po (*normalised*) normalizacji. Wykresy dla próbek z komórek HEK293T (A); wykresy dla próbek z komórek HEK293T No_Dice (B). Normalizacja została przeprowadzona za pomocą pakietu edgeR (v3.36.0). CPM — zliczenie na milion (ang. *counts per milion*); NoDICE — próbki z komórek HEK293T No_Dice; wt — próbki dla komórek HEK293T traktowanych odczynnikiem do transfekcji; e1 — próbki z komórek po transfekcji pDNA niosącym sekwencję kodującą Dicer1e. Niebieską linią zaznaczono medianę; liniami przerywanymi zaznaczono odchylenia standardowe; czarnymi kropkami zaznaczono wartości odstające. Wykresy zostały wygenerowane w R (v4.1.2) [152].

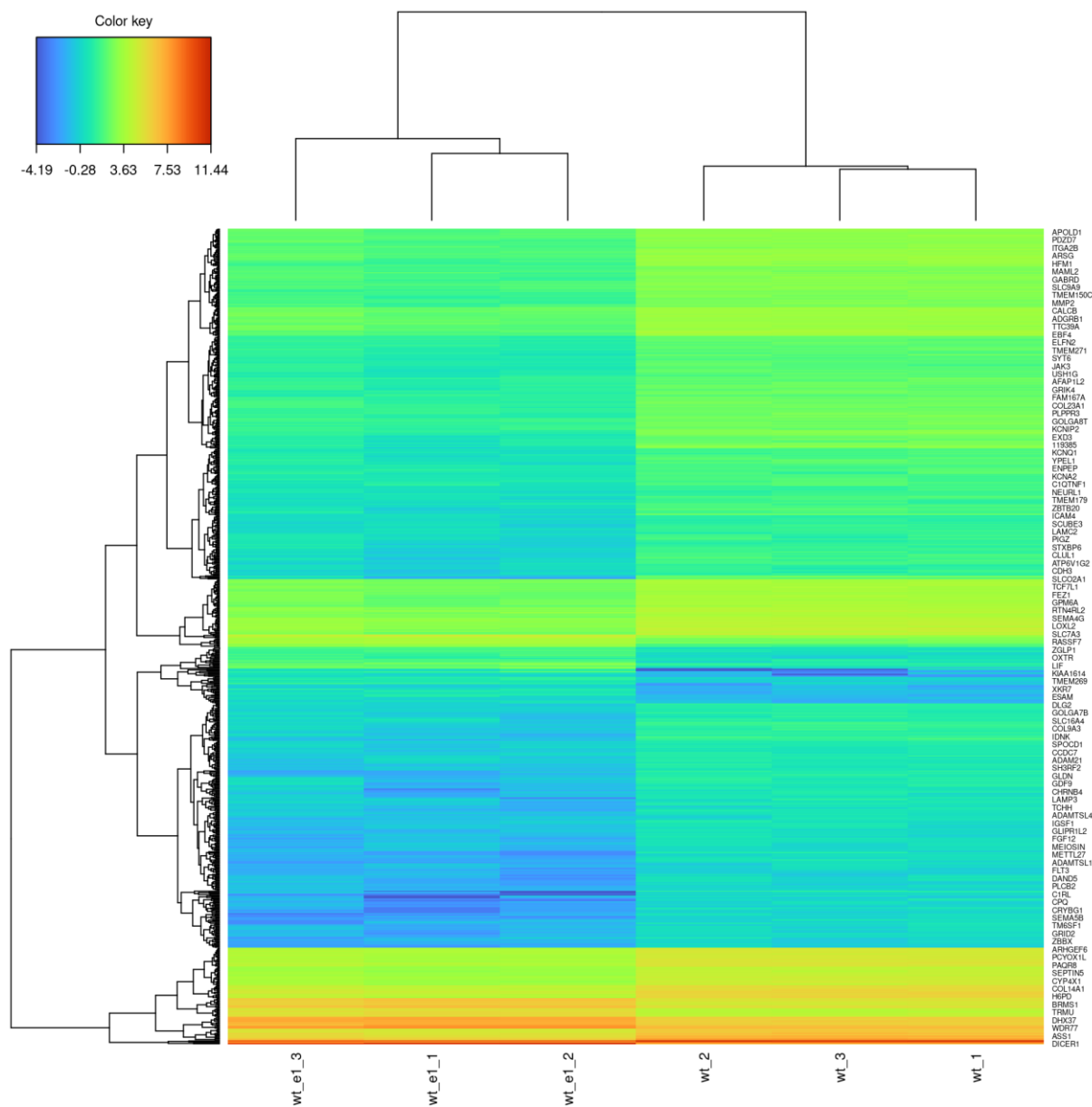
Uzyskane dane zostały wykorzystane do przeprowadzenia analizy różnicowej ekspresji genów (DEGs, ang. *differentially expressed genes*). Analizy te zostały przeprowadzone dla dwóch układów badawczych: (i) komórek HEK293T+Dicer1e w porównaniu do komórek HEK293T typu dzikiego oraz (ii) komórek HEK293T No_Dice+Dicer1e w porównaniu do komórek HEK293T No_Dice traktowanych odczynnikiem do transfekcji. Do analizy różnicowej ekspresji genów zostały wybrane geny, które miały zachowane co najmniej 10 odczytów w próbce. W wyniku zastosowanego filtru, dalszej analizie poddano 12 955 genów dla komórek w układzie HEK293T oraz 13 295 genów dla komórek w układzie HEK293T No_Dice. Za geny ulegające ekspresji różnicowej uznano takie, dla których spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich FDR (ang. *false discovery rate*) był mniejszy niż 0,05. Jako geny ulegające podwyższonej ekspresji w komórkach po transfekcji konstrukcją *Dicer1e::3xFlag* uznawano takie geny, dla których logarytm o podstawie 2 z krotności zmiany ekspresji genu (FC, ang. *fold change*), względem próby kontrolnej, był większy od 1 ($\log_2 FC > 1$). Natomiast gdy wartość ta była mniejsza od -1, ekspresję genu w komórkach po transfekcji konstrukcją *Dicer1e::3xFlag* uznawano za obniżoną względem próby kontrolnej ($\log_2 FC < -1$). Zastosowana wartość parametru $|\log_2 FC| > 1$ umożliwiła wybranie do analiz tylko takich genów, które wykazywały co najmniej dwukrotną zmianę poziomu ekspresji w obrębie danego układu.

Porównując próbki pochodzące z komórek HEK293T+Dicer1e, do próbek pochodzących z komórek typu dzikiego (wt), udało się zidentyfikować 828 genów o istotnej statystycznie zmienionej ekspresji ($FDR < 0,05; |\log_2 FC| > 1$). Spośród nich, zwiększony poziom ekspresji wykazywały 103 geny, natomiast zmniejszony poziom ekspresji wykazywało 725 genów. 12 127 genów nie wykazywało statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji pomiędzy badanymi układami (Rysunek 37).



Rysunek 37. Graficzne przedstawienie rozkładu różnicowej ekspresji genów w komórkach HEK293T+Dicer1e w porównaniu do komórek typu dzikiego. Kolorem niebieskim zaznaczono geny ulegające obniżonej ekspresji; kolorem czerwonym zaznaczono geny ulegające zwiększonej ekspresji ($FDR < 0,05; |\log FC| > 1$); kolorem czarnym zaznaczono geny niewykazujące istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji. CPM – zliczenie na milion (ang. *counts per milion*); *fold change* – krotność zmiany odczytu. Rysunek został wygenerowany za pomocą pakietu edgeR (v3.36.0) [136] w R (v4.1.2) [152].

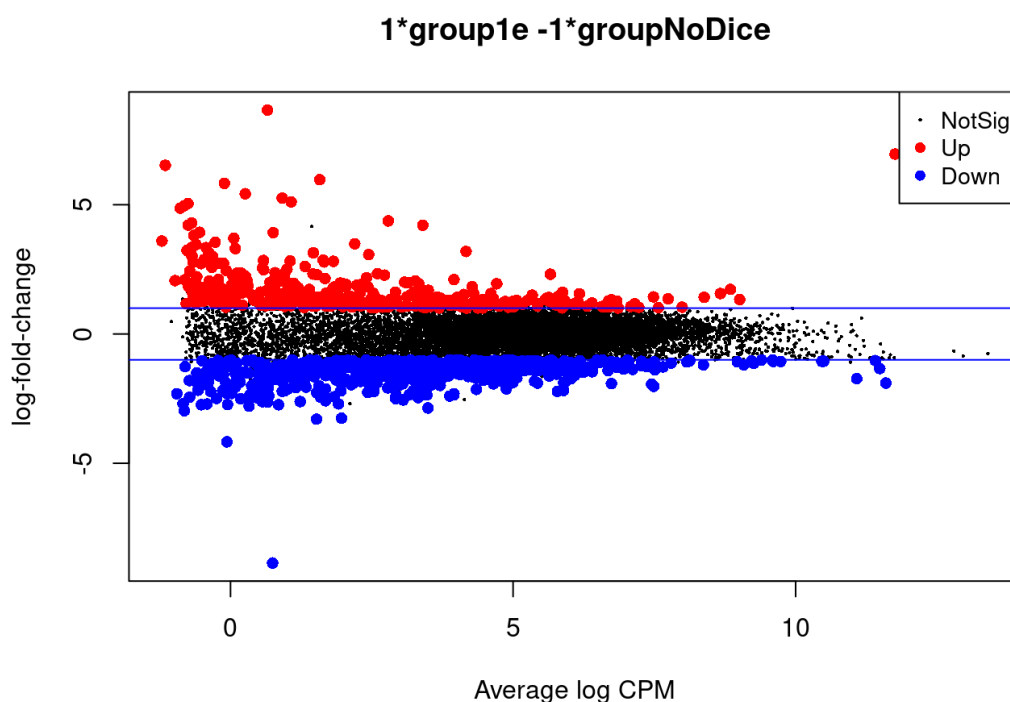
Istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji genów pomiędzy komórkami HEK293T+Dicer1e a komórkami typu dzikiego zostały przedstawione graficznie w postaci mapy ciepła (ang. *heatmaps*) (Rysunek 38).



Rysunek 38. Mapa ciepła istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genów pomiędzy komórkami HEK293T+Dicer1e a komórkami typu dzikiego. Kolorami zaznaczono wartość logarytmu z liczby zliczeń na milion (CPM) – $\log_2(\text{CPM})$. Wt_e1 – komórki HEK293T+Dicer1e; wt – komórki typu dzikiego. Liczbami od 1 do 3 zaznaczono poszczególne powtórzenia biologiczne. Mapa ciepła ekspresji genów została wygenerowana za pomocą pakietu mixOmics (v6.18.1) [137] w R (v4.1.2) [152].

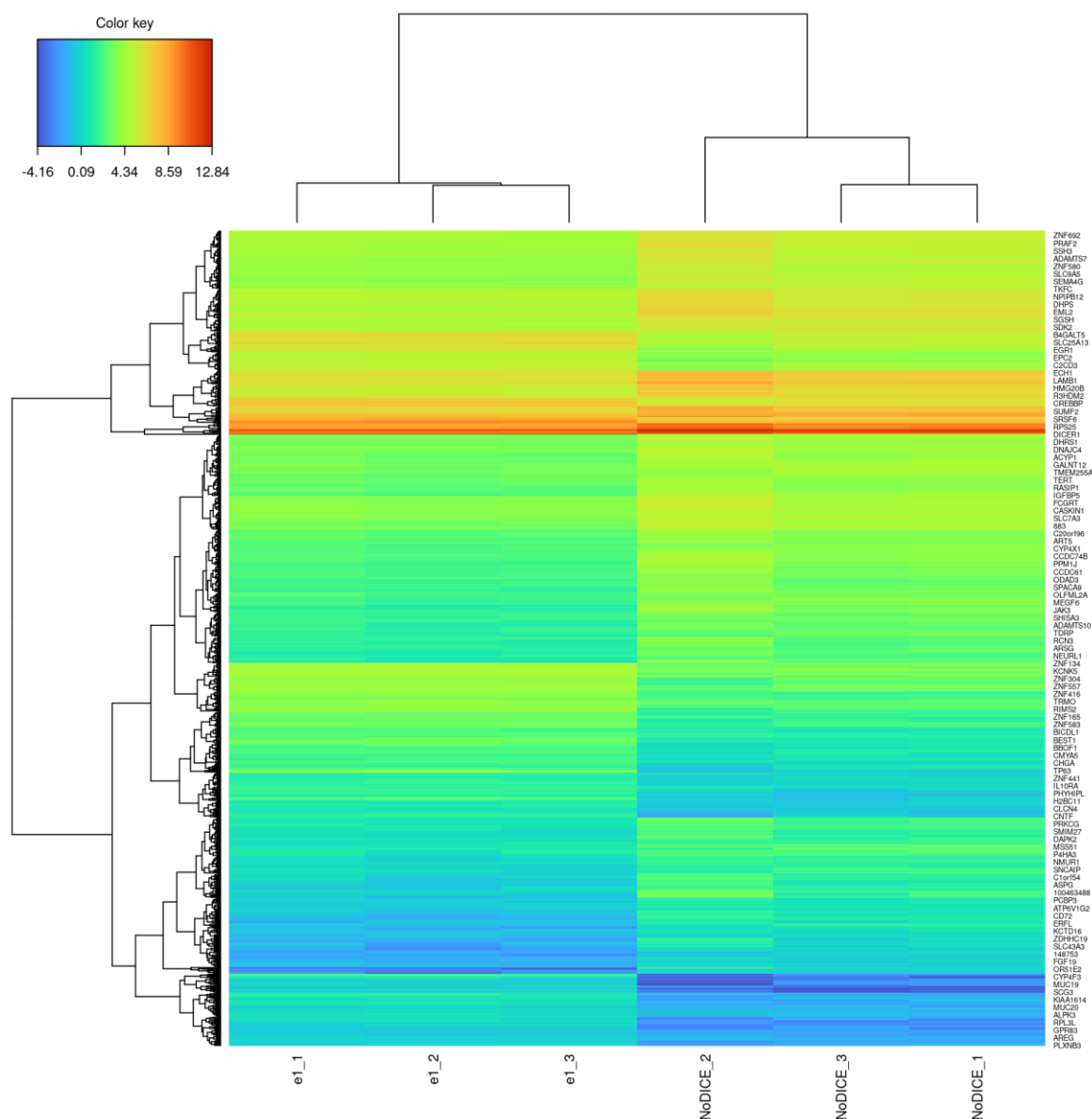
W przypadku porównania próbek pochodzących z komórek HEK293T No_Dice+Dicer1e, do próbek pochodzących z komórek HEK293T No_Dice traktowanych odczynnikami do transfekcji, udało się zidentyfikować 1067 genów o istotnej statystycznie różnicy w poziomie ekspresji ($\text{FDR} < 0,05$; $|\log\text{FC}| > 1$). Spośród nich, zwiększony poziom ekspresji wykazywało 700 genów, natomiast obniżony poziom ekspresji wykazywało 367

genów. 12 228 genów nie wykazywało statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji pomiędzy badanymi układami (Rysunek 39).



Rysunek 39. Graficzne przedstawienie rozkładu różnicowej ekspresji genów w komórkach HEK293T No_Dice+Dicer1e w porównaniu do komórek traktowanych odczynnikami do transfekcji. Kolorem niebieskim zaznaczono geny ulegające obniżonej ekspresji; kolorem czerwonym zaznaczono geny ulegające zwiększonej ekspresji ($FDR < 0,05; |\log FC| > 1$); kolorem czarnym zaznaczono geny nie wykazujące istotności statystycznej. CPM – zliczenie na milion (ang. *counts per million*); *fold change* – krotność zmiany odczytu. Rysunek został wygenerowany za pomocą pakietu edgeR (v3.36.0) [136] w R (v4.1.2).

Istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji genów pomiędzy komórkami HEK293T No_Dice+Dicer1e a komórkami traktowanymi odczynnikami do transfekcji zostały przedstawione graficznie w postaci mapy ciepła (Rysunek 40).



Rysunek 40. Mapa ciepła istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genów pomiędzy komórkami HEK293T No_Dice+Dicer1e a komórkami traktowanymi czynnikiem do transfekcji. Kolorami zaznaczono wartość logarytmu z liczby zliczeń na milion (CPM) – $\log_2(\text{CPM})$. e1 – komórki HEK293T No_Dice+Dicer1e; NoDICE – komórki traktowane odczynnikami do transfekcji. Liczbami od 1 do 3 zaznaczono poszczególne powtórzenia biologiczne. Mapa ciepła ekspresji genów została wygenerowana za pomocą pakietu mixOmics (v6.18.1) [137] w R (v4.1.2).

Podsumowując, analiza transkryptomu komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice wykazała obecność wielu genów, których poziom ekspresji znacząco się różnił pomiędzy badanymi układami. W układzie porównującym komórki HEK293T+Dicer1e z komórkami traktowanymi czynnikiem do transfekcji (HEK293T) uzyskano 828 genów: 103 geny ze

zwiększonym poziomem ekspresji oraz 725 genów ze zmniejszonym poziomem ekspresji. W układzie porównującym komórki HEK293T No_Dice+Dicer1e z komórkami traktowanymi odczynnikiem do transfekcji (HEK293T No_Dice) zidentyfikowano natomiast 1067 genów: 700 genów ze zwiększonym poziomem ekspresji oraz 367 genów ze zmniejszonym poziomem ekspresji. Następnie postanowiono sprawdzić, czy wśród zidentyfikowanych puli genów o zmienionej ekspresji występują geny, które są wspólne dla obu analizowanych układów komórkowych (tzn. ulegają zwiększonej lub obniżonej ekspresji po transfekcji konstrukcją *Dicer1e::3xFlag*, zarówno w komórkach HEK293T, jak i w komórkach HEK293T No_Dice). Przeprowadzone analizy porównawcze wykazały, iż w obu analizowanych układach, 40 wspólnych genów charakteryzowało się zwiększonym poziomem ekspresji, natomiast 220 wspólnych genów charakteryzowało się obniżonym poziomem ekspresji. Analiza ta pozwoliła wytypować geny, dla których wzrost lub obniżenie poziomu ekspresji warunkowane były produkcją wariantu Dicer1e w komórce. Listę wspólnych genów charakteryzujących się zwiększonym lub obniżonym poziomem ekspresji przedstawiono w formie Tabel S1 i S2 w Załączniku nr 1 dołączonym do elektronicznej wersji rozprawy doktorskiej.

Wyselekcjonowane geny poddano analizie opartej na ontologii genów (GO, ang. *gene ontology*). Analiza GO pozwoliła na stworzenie tzw. „funkcjonalnych zbiorów” wyselekcjonowanych genów wraz z przypisaniem kategorii GO reprezentującej dany zbiór. Analiza GO wraz z wzbogaceniem zestawu genów różnicujących (GSEA, ang. *gene set enrichment analysis*) została przeprowadzona przy użyciu pakietu GOfuncR (v1.14.0) [138] w R (v4.1.2) [152]. Przeprowadzona analiza pozwoliła przypisać geny do kategorii GO, które są podzielone na trzy grupy funkcyjne: (i) „proces biologiczny” (ang. *biological process*), (ii) „funkcje molekularne” (ang. *molecular function*) lub (iii) „komponent komórkowy” (ang. *cellular component*). W analizie GO uwzględniono tylko takie kategorie GO, dla których istotne statystycznie występowanie w danym zbiorze genów było mniejsze niż 0,001 ($p\text{-value} < 0,001$).

Zbiór genów, charakteryzujących się podwyższonym poziomem ekspresji związanej z produkcją Dicer1e, obejmował w znacznej większości kategorie GO należące do grupy „proces biologiczny”. Przykładowe kategorie w obrębie tej grupy przedstawiono w Tabeli 5.4. Dominującą grupę genów w każdej kategorii GO stanowiły geny kodujące białka histonowe:

H2BC11, H4C1, H4C11, H4C12, H4C13, H4C14, H4C15, H4C16, H4C2, H4C3, H4C4, H4C5, H4C6, H4C8, H4C9.

Tabela 5.4 Przykładowe kategorie GO dla genów charakteryzujących się podwyższonym poziomem ekspresji związanej z produkcją Dicer1e.

Grupa GO	Nr referencyjny GO	Nazwa kategorii GO
Proces biologiczny	GO:0006335	„składanie nukleosomu zależne od replikacji DNA”
	GO:0034723	„organizacja nukleosomu zależna od replikacji DNA”
	GO:0006336	„składanie nukleosomu niezależne od replikacji DNA”
	GO:0034724	„organizacja nukleosomu niezależna od replikacji DNA”
	GO:0006352	„inicjacja transkrypcji DNA”
	GO:0065004	„formowanie się kompleksów DNA-białko”
	GO:0006333	„kondensacja i dekonkondensacja chromatyny”
	GO:0032200	„organizacja telomerów”
	GO:0006323	„upakowanie DNA”
	GO:0071103	„zmiana konformacji DNA”
	GO:0006325	„organizacja chromatyny”
	GO:0031497	„składanie chromatyny”
	GO:0051276	„organizacja chromosomu”
	GO:0016070	„metabolizm RNA”
	GO:0032774	„biosynteza RNA”
	GO:0090304	„proces metabolizmu kwasów nukleinowych”
	GO:0010467	„ekspresją genów”
	GO:0034654	„biosynteza związków zawierających zasady azotowe”
	GO:0006139	„metabolizm związków zawierających zasady azotowe”
	GO:0034622	„składanie kompleksu zawierającego białka komórkowe”

GO:0002682	„regulacja procesów układu odpornościowego”
GO:0006996	„organizacja organelli komórkowych”
GO:0071840	„organizacja lub biogeneza składników komórkowych”
GO:0016043	„organizacja komponentów komórkowych”

W przypadku genów charakteryzujących się obniżonym poziomem ekspresji związanej z nadprodukcją Dicer1e, obejmowały one w znacznej większości kategorie GO należące do grupy: „proces biologiczny” oraz „komponent komórkowy”. Przykładowe kategorie w obrębie tych dwóch grup przedstawiono w Tabeli 5.5.

Tabela 5.5 Przykładowe kategorie GO dla genów charakteryzujących się obniżonym poziomem ekspresji związanej z nadprodukcją Dicer1e.

Grupa GO	Nr referencyjny GO	Nazwa kategorii GO
Proces biologiczny	GO:0030198	„organizacja macierzy zewnątrzkomórkowej”
	GO:0043062	„organizacja struktury zewnątrzkomórkowej”
	GO:0045229	„organizacja zewnętrznej struktury enkapsulacji”
	GO:0048731	„rozwój systemu”
	GO:0051093	„negatywna regulacja procesu rozwojowego”
	GO:0048468	„rozwój komórek”
	GO:0007275	„rozwój organizmu wielokomórkowego”
	GO:0030154	„różnicowanie komórek”
	GO:0007155	„adhezja komórek”
	GO:0048869	„rozwój komórkowy”
	GO:0048856	„rozwój struktur anatomicznych”
	GO:0030199	„organizacja włókien kolagenowych”
	GO:0032502	„proces rozwojowy”

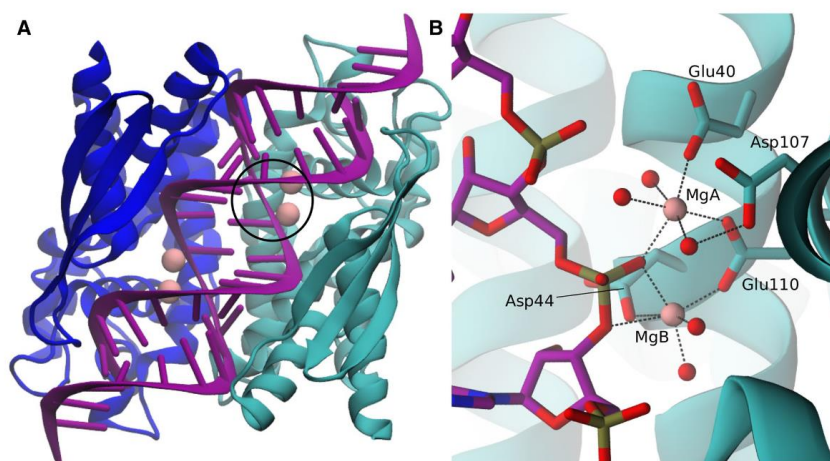
	GO:0048646	„tworzenie struktur anatomicznych zaangażowanych w morfogenezę”
	GO:0034330	„organizacja połączeń międzykomórkowych”
	GO:0050793	„regulacja procesu rozwojowego”
	GO:0006811	„transport jonów”
	GO:0009888	„rozwój tkanek”
	GO:0034220	„transport transbłonowy jonów”
	GO:0030336	„negatywna regulacja migracji komórek”
Komponent komórkowy	GO:0031012	„macierz zewnątrzkomórkowa”
	GO:0030312	„zewnątrzna struktura enkapsulacji”
	GO:0062023	„macierz zewnątrzkomórkowa zawierająca kolagen”
	GO:0030054	„połączenie międzykomórkowe”
	GO:0005887	„integralny składnik błony komórkowej”
	GO:1902495	„kompleks transportera transmembranowego”
	GO:0034702	„kompleks kanału jonowego”

Pełną listę wybranych kategorii GO wraz z przypisaną im listą genów przedstawiono w formie Tabel S3 i S4 w Załączniku nr 1 dołączonym do elektronicznej wersji rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, zebrane wyniki sugerują, iż nadprodukcja wariantu Dicer1e w komórkach może prowadzić do: (i) zwiększenia ekspresji genów odpowiedzialnych za replikację, jak i organizację DNA oraz (ii) obniżenia ekspresji genów odpowiedzialnych za adhezję komórek, organizację macierzy zewnątrzkomórkowej, czy organizację połączeń międzykomórkowych. Ponadto uzyskane wyniki sugerują, iż wariant Dicer1e może być zaangażowany w proces metabolizmu komórkowych RNA. Wyniki te są spójne z uprzednio otrzymanymi wynikami dotyczącymi aktywności RNazowej Dicer1e zarówno w warunkach *in vitro* (Rysunek 32), jak i *in cellulo* (Rysunek 33).

6. Dyskusja

hDicer jest białkiem wielodomenowym zaliczanym do rodziny RNaz III. RNazy III hydrolizują wiązania fosfodiesterowe znajdujące się w dsRNA, generując dupлексы RNA zawierające grupę fosforanową na końcu 5' i dwa niesparowane nukleotydy z grupą hydroksylową na końcu 3' [28]. Hydroliza substratu dsRNA zachodzi w obrębie doliny katalitycznej tworzonej przez dwie domeny RNazowe, przy czym każda z domen działa niezależnie od siebie i przecina tylko jedną z nici dupлексу RNA. Mechanizm rozpoznawania i cięcia substratu dsRNA przez białka należące do rodziny RNaz III został najlepiej poznany w przypadku bakteryjnej RNazy III pochodzącej z *E. coli* [27, 153]. RNaza III *E.coli* zbudowana jest z tylko z jednej domeny RNazy III oraz domeny dsRBD i musi utworzyć homodimer w celu powstania funkcjonalnego centrum katalitycznego enzymu i hydrolizy dsRNA [27]. Struktury krystalograficzne bakteryjnej RNazy III opracowane przez Gan i wsp. pokazują, że homodimer domen RNazowych tworzy dolinę katalityczną, w obrębie której wiązany jest dsRNA. Każda z domen RNazowych zawiera dwie ujemnie naładowane reszty kwasu asparaginowego (Asp44 i Asp107) i kwasu glutaminowego (Glu40 i Glu110), w obrębie których zachodzi wiązanie dwóch jonów magnezu Mg^{2+} (Rysunek 41) [154, 155].



Rysunek 41. Fragment doliny katalitycznej tworzonej przez homodimer domen RNazowych *E. coli* w kompleksie z substratem dsRNA (struktura 2NUG w bazie danych PDB) (A). Kolorem niebieskim i morskim oznaczono domeny RNazowe. Kolorem fioletowym oznaczono dsRNA; kolorem różowym oznaczono jony magnezu Mg^{2+} . Czarnym kółkiem oznaczono miejsce katalityczne. Szczegółowe przedstawienie centrum katalitycznego domeny RNazowej (B). Kolorem fioletowym oznaczono dsRNA; kolorem różowym

oznaczono jony magnezu Mg^{2+} . Liniami przerywanymi oznaczono wiązania koordynacyjne. Rysunek pochodzi z publikacji Drusin i wsp. [156].

Pierwszy z jonów jest zaangażowany w hydrolizę substratu. Drugi jon jest zaangażowany w wiązanie dsRNA i stabilizację kompleksu białko-RNA [73, 74, 78, 154, 155]. Na podstawie badań strukturalnych, Gan i wsp. zaproponowali mechanizm hydrolizy dsRNA, w którym cząsteczka wody (lub jon OH^-), skoordynowana z jonem magnezu Mg^{2+} , wykonuje atak nukleofilowy na atom fosforu w obrębie wiązania fosfodiesterowego, powodując jego hydrolizę. W rezultacie powstaje dupleks RNA z resztą fosforanową na końcu 5' i z grupą hydroksylową na końcu 3' [154, 155].

Rybonukleaza Dicer jest białkiem wielodomenowym, dostępne dane literaturowe wskazują jednakże na istnienie naturalnie występujących wariantów Dicer pozbawionych niektórych z domen. Przykładem takiej skróconej formy Dicer jest wariant pozbawiony domeny helikazowej, zidentyfikowany w oocytach mysich [120]. Wariant ten jest nazwany Dicer⁰ i powstaje na skutek alternatywnego składania pierwotnego transkryptu kodującego białko pełnej długości. W porównaniu do białka Dicer pełnej długości, wariant pozbawiony domeny helikazowej wykazuje większą efektywność cięcia substratów dsRNA (pre-siRNA) do siRNA [120]. Co ciekawe, białko pochodzące z wiciowca *Giardia intestinalis* składa się jedynie z domeny PAZ oraz dwóch domen RNazy III, które tworzą podstawowy trzon funkcjonalny wszystkich białek Dicer [28]. Należy również wspomnieć o białku typu Dicer występującym w jednokomórkowej zielonej aldze *Chlamydomonas reinwardtii*. Białko to nosi nazwę DCL3 i pozbawione jest domeny PAZ, jednakże brak kluczowej domeny kotwiczącej RNA nie wpływa na zdolność białka DCL3 do generowania większości miRNA w komórce [157]. Charakterystyczną cechą białka DCL3 z *C. reinwardtii* jest posiadanie domeny bogatej w prolinę, która jest zlokalizowana na jego końcu N. Podobna domena występuje w rybonukleazach Drosha, które również nie posiadają domeny PAZ [158]. Domniemywa się, iż białko DCL3 z *C. reinwardtii* może równocześnie pełnić funkcję rybonukleazy Drosha i Dicer [157]. Opisane warianty białek typu Dicer są pozbawione domeny helikazowej lub PAZ. Warto przypomnieć, iż domeny te pełnią kluczową rolę w procesie wiązania substratu RNA przez Dicer. Domena helikazowa jest zaangażowana w oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA, co pozwala na dopasowanie tego substratu w obrębie centrum katalitycznego enzymu, a także na dyskryminację pomiędzy substratami pre-miRNA i pre-siRNA [90]. W obrębie domeny PAZ występuje tzw. kieszeń wiążąca 3', która rozpoznaje i wiąże dwunukleotydowy niesparowany koniec 3' substratu (pre-miRNA oraz pre-siRNA) [28, 58,

81, 82]. Grupa fosforanowa na końcu 5' substratu wiązana jest natomiast w tzw. kieszeni wiążącej 5' występującej w obrębie domeny Platformy i PAZ [83, 84]. Pomimo braku domeny helikazowej lub domeny PAZ, białka Dicer⁰ oraz DCL3 posiadają zdolność do oddziaływania z substratami pre-miRNA oraz pre-siRNA i generowania dojrzałych produktów miRNA i siRNA. Dane te wskazują, iż w przypadku braku domeny helikazowej lub PAZ pozostałe domeny Dicer mogą brać udział w wiązaniu substratów RNA.

Biorąc pod uwagę fakt, iż miejsce cięcia substratów RNA przez hDicer determinowane jest odległością pomiędzy domeną PAZ a domenami RNazowymi [69, 74, 85], a także ważną rolę domeny helikazowej oraz dsRBD w precyzyjnym cięciu substratów [30, 73, 89, 90], brak niniejszych domen może wpływać na długość produktów RNA generowanych przez hDicer. W przypadku wariantu hDicer posiadającego tylko obie domeny RNazy III oraz domenę dsRBD, zaobserwowano generowanie produktów cięcia pre-miRNA oraz dsRNA o długości ~15 nt [90]. Co ciekawe, białka oddziałujące z hDicer mogą także wpływać na długość generowanych produktów RNA. Wykazano, iż oddziaływanie hDicer z 5LO, enzymem zaangażowanym w biosyntezę mediatorów stanu zapalnego, wpływa na miejsce (pozycję) cięcia pre-miRNA przez hDicer [101]. Dokładniej, w wyniku oddziaływania hDicer z 5LO dochodzi do generowania przez hDicer produktów RNA o długości ~55 nt i ~10-12 nt [101]. Domniemywa się, że zmiana długości generowanych produktów RNA jest spowodowana zmianą aranżacji domen hDicer w kompleksie z 5LO [100]. Zaobserwowano także, iż wiązanie białka Ago2 do hDicer powoduje zahamowanie cięcia substratów pre-miRNA przez rybonukleazę hDicer [159]. Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej badania wykazały, iż otrzymane metodami inżynierii genetycznej warianty delecyjne hDicer Δ PAZ oraz Δ PPC nie hydrolizują substratów pre-miRNA oraz pre-siRNA (Rysunek 12). Obserwowany brak cięcia kanonicznych substratów hDicer wynika najprawdopodobniej z braku możliwości związania wspomnianych substratów przez warianty hDicer Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 13). Jednakże, warianty te posiadają zdolność do hydrolizowania jednoniciowych cząsteczek RNA o długości miRNA/siRNA; w reakcjach z Δ PAZ oraz Δ PPC i substratami o długości miRNA/siRNA zaobserwowano docinanie substratu, pierwotnie do produktów długości 15 i 6 nt, a ostatecznie do produktów o długości ~1/2 nt (Rysunek 14B). W reakcjach z tymi samymi substratami hDicer pełnej długości również generowała produkty o długości: 15, 6 i ~1/2 nt, jednakże proces ten był zdecydowanie mniej wydajny, w porównaniu do wydajności produkcji odpowiednich produktów przez warianty Δ PAZ oraz Δ PPC (Rysunek 14). Produkty RNA o długości ~2-5 nt, powstające w wyniku cięcia przez

hDicer zarówno substratów RNA o strukturze spinki do włosów jak i dsRNA, były obserwowane także przez inne grupy badawcze [143]. Mechanizm molekularny, który prowadzi do powstawania takich krótkich produktów RNA, jak i jego znaczenie biologiczne nie zostały jeszcze wyjaśnione. Zauważono natomiast, że powstawanie krótkich produktów RNA jest zależne od obecności jonów Mg^{2+} (Rysunek 14), co wskazuje, że powstawanie tych produktów jest zależne od aktywności domen RNazy III hDicer. Wcześniejsze badania prowadzone w IChB PAN wykazały, że hDicer, oprócz kanonicznych substratów, wiąże także krótkie cząsteczki RNA o zróżnicowanej strukturze drugorzędowej [79]. Wiadomo również, że hDicer wydajnie wiąże jednoniciowe RNA o długości > 20 nt [104, 160]. Ponadto, dane literaturowe wskazują, iż hDicer może produkować RNA o długości ~ 12 nt i krótsze (tzw. semi-miRNA) [161]. Przytoczone dane literaturowe, wraz z wynikami otrzymanymi podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej sugerują, że hDicer może być zaangażowana w proces wiązania i docinania krótkich RNA, a w procesie tym nie uczestniczy domena PAZ, czy też cała kasetta PPC (Rysunek 14). Przepuszczalnie inne domeny hDicer biorą także udział w wiązaniu krótkich RNA. Przykładowo, jednoniciowe RNA mogą być wiązane przez domenę DUF283 hDicer [99]. Uzyskane wyniki sugerują, iż hDicer mogłaby być potencjalnie zaangażowana w proces degradacji nici pasażerskiej podczas procesu tworzenia aktywnego kompleksu RISC.

Zarówno specyficzność substratowa, jak i długość produktów generowanych przez poszczególne białka Dicer, warunkowane są obecnością określonych domen, jak i ich wzajemną orientacją przestrzenną w obrębie danego białka Dicer [86]. Zmiany w przestrzennym ułożeniu domen oraz ich aranżacji mogą powodować zmianę specyficzności rozpoznawanego substratu. Przykładem jest wariant Dicer tDCR-1 *C. elegans* powstający podczas procesu apoptozy w wyniku proteolitycznego cięcia Dicer przez kaspazę CED-3 [128]. tDCR-1 składa się z fragmentu domeny RNazy IIIa, domeny RNazy IIIb oraz domeny dsRBD. Przeprowadzone modelowanie trzeciorzędowej struktury Dicer pełnej długości oraz wariantu tDCR-1 wykazały zasadniczą zmianę konformacji domeny RNazy IIIa (Rysunek 5). W modelu dla pełnej długości Dicer dwie domeny RNazy III tworzą wewnątrzcząsteczkowy dimer. Dwa katalityczne miejsca, z których każde zawiera cztery reszty kwasowe, są odsłonięte na powierzchni płytkiego rowka i oddalone są od siebie o ~ 20 Å, co jest optymalne dla wiązania substratu dsRNA (Rysunek 5A oraz Rysunek 41). Przecięcie Dicer w obrębie domeny RNazy IIIa przez CED-3, skutkuje rotacją pozostałej części domeny RNazy IIIa z jej pierwotnej pozycji w kierunku domeny RNazy IIIb, co powoduje powstawanie głębszego

i węższego rowka z szczeliną o szerokości około 21 Å. Powstała szczelina umożliwia związanie i hydrolizę substratu dsDNA, który w komórkach występuje głównie w formie helisy B o średnicy około 20 Å [129]. Średnica dsRNA wynosi ~23 Å [162]. Jak wykazano, tDCR-1 *C. elegans* nie posiada aktywności RNazowej względem substratu dsRNA, natomiast wykazuje aktywność DNazową i posiada zdolność do generowania pęknięć w obrębie chromosomalnego DNA [128]. Co ważne, aktywność DNazowa tDCR-1, podobnie jak aktywność RNazowa Dicer pełnej długości, jest zależna od obecności jonów Mg^{2+} [128]. Zmiana specyficzności rozpoznawania substratu przez tDCR-1 jest przypuszczalnie spowodowana utratą fragmentu domeny RNazy IIIa, w tym dwóch, z czterech, reszt katalitycznych, co zakłóca tworzenie się stabilnego wewnątrzcząsteczkowego dimeru domen RNazy III [128]. Ponadto, utrata dwóch reszt katalitycznych skutkuje utratą aktywności hydrolitycznej domeny RNazy IIIa [128]; w istocie, t-DCR-1 hydrolizowała tylko jedną nić w duplesie DNA [129].

Przeprowadzone w warunkach *in vitro* testy aktywności hydrolitycznej z wykorzystaniem ssDNA i dsDNA oraz szeregu wariantów delecyjnych hDicer wykazały, iż hDicer posiada potencjał do hydrolizy substratów typu DNA. Aktywność DNazową wykazywały warianty pozbawione domeny DUF283 (Rysunek 20 i 21) oraz warianty nieposiadające domeny PAZ lub całej kasety PPC (Rysunek 15 i 16). Warianty Δ PAZ i Δ PPC docinały testowane substraty ssDNA (znakowane izotopem ^{32}P na końcu 5') o 1 nt (Rysunek 15), co sugeruje potencjalną aktywność egzonukleazową 3'→5' tych wariantów delecyjnych hDicer. Ze względu na zastosowane znakowanie izotopem ^{32}P końca 5' substratu nie można wykluczyć, iż obserwowane produkty cięcia o długości ~1 nt (Rysunek 15 i 21) nie powstawały również w wyniku aktywności egzonukleazowej 5'→3' wariantów Δ DUF283(630-709aa), Δ DUF283(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC. Warianty Δ DUF283(630-709aa), Δ DUF283(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC posiadały także zdolność do nacinania jednej z nici w dsDNA (Rysunek 22). Przypuszczalnie usunięcie domeny DUF283, bądź domen kotwiczących substrat pre-miRNA hDicer (domeny PAZ lub całej kasety PPC), mogło spowodować rearanżację strukturalną pozostałych domen hDicer, co w konsekwencji mogło skutkować udostępnieniem domen RNazowych tworzących centrum katalityczne białka, dla szerszego spektrum substratów, w tym substratów typu DNA. Warto zauważyć, iż tDCR-1 również nie posiada domeny DUF283 oraz kasety PPC [128, 129]. Niemniej jednak, pomimo obecności dwóch domen RNazowych, w przeprowadzonych doświadczeniach obserwowano jedynie nacinanie jednej z nici duplesu DNA przez warianty Δ DUF283(630-709aa),

Δ DUF283(625-752aa), Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 22). Na tej podstawie można wnioskować, iż przypuszczalnie druga nić w dsDNA nie sytuowała się w pobliżu reszt katalitycznych tworzących RNazowe centrum aktywne. Warto także zaznaczyć, iż niektóre RNazy również posiadają zdolność zarówno do wiązania, jak i hydrolizy DNA. Przykładem takiego białka jest drożdżowa RNaza Rnt1. Rnt1, podobnie jak hDicer, należy do rodziny RNaz III, jednakże w przeciwieństwie do niej, Rnt1 składa się tylko z jednej domeny RNazy III oraz domeny dsRBD i podobnie jak RNaza III *E. coli* musi utworzyć homodimer w celu powstania funkcjonalnego centrum katalitycznego enzymu i hydrolizy dsRNA [27]. Wykazano, iż Rnt1 wiąże cząsteczki dsDNA występujące w formie helisy B, a także posiada zdolność do hydrolizy cząsteczki DNA występującej w hybrydowym duplesie DNA/RNA [163]. Co więcej, bakteryjny homolog białka Ago może hydrolizować docelowe DNA wykorzystując naprowadzającą cząsteczkę DNA (ang. *guide DNA*) [164]. Za hydrolizę natywnych RNA w bakteryjnym homologu białka Ago odpowiada motyw RNazy H znajdujący się w domenie PIWI [164].

Potencjalna aktywność DNazowa hDicer może sugerować, iż w komórkach białko to może oddziaływać nie tylko z cząsteczkami RNA, ale także z cząsteczkami DNA. Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż hDicer może migrować z cytoplazmy do jądra komórkowego [108]. Obecnie coraz więcej badań skupia się na jądrowych funkcjach Dicer [92, 108, 111, 165]. Wykazano, że w jądrze komórkowym Dicer zaangażowana jest w proces naprawy DNA [115]. W wyniku naświetlania komórek promieniowaniem nadfioletowym, Dicer lokalizuje się w obrębie powstających uszkodzeń DNA, gdzie bierze udział w rozluźnianiu struktury chromatyny. Proces rozluźniania struktury chromatyny poprzedza proces naprawczy, polegający na naprawie przez wycinanie uszkodzonego nukleotydu (NER, ang. *nucleotide excision repair*) [115]. Ponadto, w rejonie powstających dwuniciowych pęknięć DNA (DSB, ang. *double-strand breaks*), w sposób zależny od Dicer powstają krótkie niekodujące RNA, tzw. diRNA lub DDRNA (ang. *DNA damage response RNA*), które odpowiadają za rekrutację czynników warunkujących rozpoczęcie mechanizmów naprawczych [166-169] i rozluźnienie struktury chromatyny [168] w miejscu uszkodzenia. Obecnie wiadomo, iż powstające pęknięcia DNA indukują fosforylację seryn w pozycji 1016 hDicer, co wywołuje migrację tej rybonukleazy z cytoplazmy do jądra komórkowego [111]. Co więcej, dodatkowa fosforylacja dwóch seryn w pozycji 1728 i 1852 jest niezbędna do hydrolizy dsRNA powstających w odpowiedzi na DSB [111]. Szereg prac opisuje oddziaływania Dicer z chromosomalnym DNA [111, 113, 115, 128]. Rozważając potencjalny

udział hDicer w procesie fragmentacji chromosomalnego DNA, należy jednak pamiętać, iż w komórkach człowieka proces nacinania chromosomalnego DNA, towarzyszący apoptozie, jest inicjowany przez nukleazę DFF40 [170, 171].

Podsumowując, badania prowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej wpisują się w nowy nurt badawczy koncentrujący się na jądrowych funkcjach białek typu Dicer. Zgromadzone dane wskazują, iż hDicer posiada potencjał do hydrolizy substratów DNA. Na obecnym etapie badań trudno jednak powiedzieć, czy i gdzie taka aktywność DNazowa mogłaby być wykorzystywana w komórkach. Bez wątpienia konieczne są dalsze badania mające na celu zdefiniowanie puli komórkowych DNA, z którymi może oddziaływać hDicer.

Gen kodujący hDicer (*DICER1*) położony jest na chromosomie 14 i składa się z 29 egzonów (Rysunek 3) [172]. Przewiduje się, że *DICER1* posiada wiele wariantów transkrypcyjnych, które powstają w wyniku inicjacji transkrypcji z alternatywnych promotorów lub w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkrypty [122, 124, 125, 150, 172]. Do tej pory zidentyfikowano 7 izoform mRNA kodujących białko hDicer pełnej długości (składające się z 1922 aa). Izoformy te różnią się między sobą długością rejonów 5' oraz 3' UTR, podczas gdy sama sekwencja kodująca białko pozostaje niezmienna [67]. Ponadto zidentyfikowano wiele izoform mRNA *DICER1* z sekwencją kodującą skrócone warianty hDicer. Jednym z przykładów jest wariant transkrypcyjny kodujący białko Dicer1e o długości 820 aa (~93 kDa) (Rysunek 30A) [125]. Obecnie niewiele wiadomo na temat potencjalnej roli biologicznej wariantu Dicer1e. Dostępne dane literaturowe wskazują, że Dicer1e powstaje w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkrypty *DICER1* [125]. Białko Dicer1e, w odróżnieniu od hDicer, posiada unikatowy koniec N oraz zaledwie trzy domeny: RNazy IIIa, RNazy IIIb oraz dsRBD. *Dicer1e* ulega ekspresji zarówno w komórkach zdrowych (prawidłowych), jak i zmienionych nowotworowo. Wiadomo, że poziom ekspresji *Dicer1e* jest tkankowo-specyficzny, a w przypadku komórek nowotworowych zależy także od typu i przypuszczalnie stopnia rozwoju nowotworu [124, 125]. Badania prowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej wykazały, iż otrzymany metodą inżynierii genetycznej Dicer1e nie generuje miRNA oraz siRNA (Rysunek 31). Jednakże, wariant ten posiada zdolność do hydrolizowania krótkich RNA, ostatecznie generując produkty cięcia o długości ~1/2 nt (Rysunek 32). Pomimo obecności takich samych domen, czyli domeny RNazy IIIa i IIIb oraz domeny dsRBD, warianty Dicer1e i Δ Helikaza-

PAZ (Rysunek 30A) generowały produkty cięcia o różnej długości z tych samych substratów RNA (Rysunek 31 i 32). Niemniej jednak wariant Δ Helikaza-PAZ również nie generował produktów o długości miRNA/siRNA (Rysunek 31). Należy przypomnieć, iż brak zdolności do generowania produktów cięcia o długości miRNA i siRNA, jak również zdolność do hydrolizy krótkich RNA i generowanie produktów cięcia o długości $\sim 1/2$ nt zostały także zaobserwowane dla wariantów Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 12 i 14). Z uwagi na fakt, iż wszystkie z domen hDicer mogą oddziaływać z RNA [28, 58, 72, 73, 81, 82, 89, 90, 99], usunięcie jednej z nich nie musi skutkować utratą zdolności cięcia związanego substratu, pod warunkiem, iż substrat ten ma możliwość dopasowania się do doliny katalitycznej hDicer. Przypuszczalnie, w zależności od tego, która z domen hDicer zwiąże dany substrat RNA, obserwuje się różny wzór cięcia, charakterystyczny dla wzajemnej orientacji przestrzennej domen wiążących i tnących dany substrat, w danym wariacie delecyjnym hDicer. Co ciekawe, najnowsze dane wskazują, iż u grzyba *Mucor lusitanicus* funkcja Dicer została zastąpiona przez białko R3B2, nietypową RNazę III, która ze względu na swoją strukturę centrum aktywnego posiada zdolność do cięcia tylko jednoniciowych substratów RNA [173]. RNaza R3B2 zawiera jedną domenę RNazy III oraz dwie domeny dsRBD [173]. Wyniki badań *in vitro* dotyczące degradacji krótkich RNA przez wariant Dicer1e, korespondują z wynikami badań prowadzonych w warunkach *in cellulo*. Przeprowadzone badania wykazały, iż w komórkach HEK293T No_Dice produkujących wariant Dicer1e, po 48 godzinach od transfekcji, poziom krótkich RNA zawierających sekwencję miRNA 16-1, miRNA 21 lub miRNA 92a był około czterokrotnie niższy, w porównaniu do poziomu badanych krótkich RNA w komórkach kontrolnych nieprodukujących formy Dicer1e (Rysunek 33). Należy zaznaczyć, iż pomimo braku endogennej hDicer, w komórkach HEK293T No_Dice powstają krótkie RNA o długości w zakresie od 16 do 26 nt zawierające sekwencję miRNA [67]. Natomiast po 72 godzinach od transfekcji komórek HEK293T No_Dice wektorem niosącym sekwencję kodującą Dicer1e nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie badanych krótkich RNA, w porównaniu do komórek kontrolnych (Rysunek 33). Przypuszczalną przyczyną zaobserwowanych rozbieżności może być wpływ różnych czynników komórkowych na metabolizm analizowanych krótkich RNA. Co ważne, poziom białka Dicer1e był porównywalny pomiędzy 48 a 72 godziną, licząc od momentu transfekcji plazmidem niosącym sekwencję kodującą Dicer1e (Rysunek 28), zatem obserwowane różnice w poziomie badanych krótkich RNA, pomiędzy 48 a 72 godziną, najprawdopodobniej nie wynikały z różnic w poziomie białka Dicer1e. W przypadku komórek HEK293T, nie zaobserwowano zmiany poziomu wszystkich analizowanych miRNA pomiędzy komórkami produkującymi wariant Dicer1e,

a komórkami kontrolnymi (Rysunek 33). Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez grupę badawczą prof. Duchaine, które to wykazały brak zmian w poziomie dojrzałych miRNA 19b oraz let-7 pomiędzy komórkami kontrolnymi (HEK293T) a komórkami po transfekcji wektorem niosącym sekwencję kodującą Dicer1e [126]. Warto zauważyć, iż pod względem budowy domenowej, wariant Dicer1e jest podobny do wariantu sDCR-1 z nicienia *C. elegans* [126]. Zarówno Dicer1e, jak i sDCR-1 posiadają tylko dwie domeny RNazy III i domenę dsRBD. U nicienia sDCR-1 powstaje w wyniku proteolitycznego cięcia Dicer pełnej długości i jest inhibitorem kompetycyjnym białek Ago, powodując akumulację pre-miRNA i redukcję dojrzałych miRNA [126]. Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej badania (Rysunek 33) sugerują, iż w warunkach fizjologicznych wariant Dicer1e nie wywiera znaczącego wpływu na poziom komórkowych miRNA. Być może jest to spowodowane zachowaniem balansu pomiędzy aktywnością hDicer pełnej długości a aktywnością wariantu Dicer1e w komórce.

Przeprowadzone w warunkach *in vitro* testy cięcia z wykorzystaniem substratów DNA wykazały, że wariant Dicer1e posiada zdolność do hydrolizy ssDNA (Rysunek 34). Podobnie jak w przypadku wariantów Δ PAZ i Δ PPC (Rysunek 15), obserwowano przycinanie ssDNA w kierunku 3'→5'. Dodatkowo wyniki wstępnych badań wykazują, iż wariant Dicer1e może hydrolizować dsDNA (dane niezaprezentowane, wymagające dalszych analiz i reakcji kontrolnych). Zdolność do hydrolizy DNA może być powiązana z lokalizacją jądrową białka Dicer1e, jednakże potencjalna rola Dicer1e w oddziaływaniu z komórkowymi DNA wymaga dalszych badań. Co ważne, pomimo podobieństwa w budowie domenowej wariantów Dicer1e (wariant powstający naturalnie) i Δ Helikaza-PAZ (wariant otrzymany metodami inżynierii genetycznej) (Rysunek 30A), wariant Δ Helikaza-PAZ nie hydrolizował wykorzystanych w badaniach substratów ssDNA (Rysunek 34). Zaobserwowana różnica może być związana z różną sekwencją początkową (sekwencją końca N) badanych białek (Rysunek 30C), co może wpływać na dostępność domen RNazowych dla substratu ssDNA.

Kolejnym etapem prac badawczych, mającym na celu określenie potencjalnej funkcji komórkowej wariantu Dicer1e, było sprawdzenie jak produkcja Dicer1e w komórce może wpłynąć na poziom ekspresji genów. W badaniach tych zastosowano analizę NGS puli całkowitego RNA komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice, które były transfekowane plazmidem umożliwiającym produkcję wariantu Dicer1e. Uzyskane dane zostały wykorzystane do przeprowadzenia analizy różnicowej transkryptomu komórek HEK293T oraz HEK293T No_Dice, w dwóch układach: (i) komórki traktowane odczynnikami do

transfekcji (tzw. typu dzikiego, wt) oraz (ii) komórki transfekowane wektorem niosącym sekwencję kodującą wariant *Dicer1e* (*Dicer1e::3xFlag*). Przeprowadzone analizy porównawcze wykazały, iż w obu analizowanych układach komórkowych, 40 tych samych genów charakteryzowało się zwiększonym poziomem ekspresji, natomiast 220 tych samych genów charakteryzowało się obniżonym poziomem ekspresji. Analiza ta pozwoliła wytypować geny, których wzrost lub obniżenie poziomu ekspresji przypuszczalnie warunkowane były produkcją wariantu *Dicer1e* w komórce. Wytypowane geny zostały poddane analizie opartej na ontologii genów, GO. Analiza GO pozwoliła na stworzenie tzw. „funkcjonalnych zbiorów” wyselekcjonowanych genów wraz z przypisaniem im kategorii GO reprezentującej dany zbiór. Kategorie GO zostały podzielone na trzy grupy funkcyjne: (i) „proces biologiczny”, (ii) „funkcje molekularne” lub (iii) „komponent komórkowy”.

Zbiór genów charakteryzujących się podwyższonym poziomem ekspresji wynikającym prawdopodobnie z obecności *Dicer1e* w komórce, obejmował w znacznej większości kategorie GO należące do grupy „proces biologiczny”, a zidentyfikowane kategorie w tej grupie stanowiły, m.in.: „kondensacja i dekonkondensacja chromatyny (GO:0006333)”, „organizacja telomerów” (GO:0032200), „upakowanie DNA” (GO:0006323), „zmiana konformacji DNA” (GO:0071103), „organizacja chromatyny” (GO:0006325), „składanie chromatyny” (GO:0031497), „organizacja chromosomu” (GO:0051276). Dominującą grupą genów w każdej z wymienionych kategorii GO stanowiły geny kodujące białka histonowe: *H2BC11*, *H4C1*, *H4C11*, *H4C12*, *H4C13*, *H4C14*, *H4C15*, *H4C16*, *H4C2*, *H4C3*, *H4C4*, *H4C5*, *H4C6*, *H4C8*, *H4C9*.

Ekspresja genów histonowych jest zależna od fazy cyklu komórkowego i jest sprzężona z replikacją DNA. Kontrola ekspresji genów histonowych zachodzi na poziomie transkrypcyjnym oraz potranskrypcyjnym [174]. Regulacja ta zapewnia utrzymanie równowagi pomiędzy procesem produkcji nowych histonów a procesem replikacji DNA, w celu prawidłowego upakowania nowo zreplikowanego DNA w chromosomy [175]. Produkcja białek histonowych, jak i replikacja DNA zachodzą w fazie S. Nieprawidłowa regulacja ekspresji genów kodujących białka histonowe i ich nadmierna akumulacja poza fazą S jest toksyczna dla komórki [176, 177]. Nadmiar histonów prowadzi, m.in. do: zaburzeń cyklu komórkowego, niestabilności genomu w postaci nadmiernej utraty chromosomów, zwiększonej wrażliwości na czynniki uszkodzające DNA i cytotoksyczności [176, 177]. Ponadto wykazano, iż u drożdży nadmiar białek histonowych wysyca enzymy modyfikujące białka histonowe, potencjalnie zakłócając ich aktywność [176]. Dodatkowo, nadmiarowe

białka histonowe wiążą się niespecyficznie z obecnymi w komórce cząsteczkami RNA i DNA, zaburzając ich metabolizm w komórce [176].

Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż komórki nowotworowe charakteryzują się podwyższonym poziomem Dicer1e w porównaniu do komórek zdrowych (prawidłowych) [124, 125]. Natomiast obniżenie poziomu białka Dicer1e w komórkach raka płaskonabłonkowego języka znacząco hamowało proliferację komórek [125]. Autorzy pracy wykazali, iż obniżenie poziomu białka Dicer1e w liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego języka (SCC-4 i SCC-25) spowodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 interfazy, uniemożliwiając komórce jej podział [125]. Podczas fazy G2 następuje synteza białek wrzeciona podziałowego oraz składników błony komórkowej niezbędnych do jej wytworzenia po zakończonym podziale komórki [178-180]. Pod koniec fazy G2 zachodzi synteza białek regulatorowych odpowiedzialnych za podział komórki [179, 180]. Badania dotyczące białek histonowych u *Drosophila melanogaster* wykazały, iż brak syntezy nowych białek histonowych powoduje nie tylko wydłużenie fazy S, ale również powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 i tym samym uniemożliwia podział komórki [181]. Dane zgromadzone podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej (Tabela 5.4 oraz Załącznik nr 1, Tabela S1 i S3) oraz dostępne dane literaturowe sugerują, iż podwyższony poziom białka Dicer1e w komórkach może powodować zwiększenie syntezy białek histonowych, które są niezbędne do upakowania powstałej kopii DNA, a tym samym wpływać na intensywną proliferację komórek nowotworowych.

W przypadku genów charakteryzujących się obniżonym poziomem ekspresji związanym z produkcją Dicer1e, geny te obejmowały w znacznej większości kategorie GO należące do grupy: „proces biologiczny” oraz „komponent komórkowy”. Przykładowe kategorie w grupie proces biologiczny stanowiły m.in.: „organizacja macierzy zewnątrzkomórkowej” (GO:0030198), „rozwój komórek” (GO:0048468), „różnicowanie komórek” (GO:0030154), „adhezja komórek” (GO:0007155), „organizacja włókien kolagenowych” (GO:0030199), „proces rozwojowy” (GO:0032502), „organizacja połączeń międzykomórkowych” (GO:0034330), „regulacja procesu rozwojowego” (GO:0050793). Do grupy komponent komórkowy zostały przyporządkowane kategorie, które stanowiły m.in.: „macierz zewnątrzkomórkowa” (GO:0031012), „połączenie międzykomórkowe” (GO:0030054), „integralny składnik błony komórkowej” (GO:0005887). Przedstawione kategorie GO wskazują, iż obniżeniu poziomu ekspresji uległy geny odpowiedzialne m. in. za: organizację cytoszkieletu, adhezję komórek, organizację macierzy zewnątrzkomórkowej,

czy organizację połączeń międzykomórkowych. Deregulacja tych procesów sugeruje, iż komórki nadprodukujące wariant Dicer1e mogą charakteryzować się zwiększoną migracją. Ponieważ wariant Dicer1e jest obecny w komórkach nowotworowych [124, 125], zwiększony potencjał migracyjny komórek może przyczynić się do progresji nowotworu i powstania guzów wtórnych w odległych narządach i tkankach. Należy zaznaczyć, iż powstawanie guzów wtórnych związane jest z lokalną migracją komórek do otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej, a następnie ich wejściu do układu krążenia [182, 183]. Proces ten jest zależny od zdolności komórek nowotworowych do przejścia z fenotypu epithelialnego do fenotypu mezenchymalnego. Dane literaturowe wskazują, iż wariant Dicer1e jest obecny zarówno w komórkach o fenotypie epithelialnym, jak i mezenchymalnym, co wraz z wynikami pochodzącymi z analiz NGS (Tabela 5.5 oraz Załącznik nr 1, Tabela S2 i S4) może wskazywać na przypuszczalny wpływ Dicer1e na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych.

Ponadto zgromadzone dane (Tabela 5.4) sugerują, iż wariant Dicer1e może być zaangażowany w metabolizm komórkowych RNA. Hipoteza ta znajduje wsparcie w wynikach badań *in vitro* (Rysunek 32) oraz *in cellulo* (Rysunek 33) dotyczących aktywności RNazowej wariantu Dicer1e.

Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej mają charakter wstępny. Potwierdzenie zaproponowanej funkcji biologicznej wariantu Dicer1e wymaga przeprowadzenia dalszych badań, w tym badań proteomicznych, a także weryfikacji poziomu ekspresji genów wytypowanych w przeprowadzonych analizach NGS (Tabela 5.4 i 5.5). Uzyskane wyniki przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat udziału białek typu Dicer w procesach komórkowych wykraczających poza ścieżki biogenezy miRNA/siRNA.

7. Wnioski

Analiza wyników otrzymanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

1. hDicer może docinać krótkie RNA o długości miRNA/siRNA, a w procesie tym nie uczestniczą przypuszczalnie domeny PAZ i Platformy, odpowiedzialne za kotwiczenie kanonicznych substratów hDicer, tj. pre-miRNA oraz pre-siRNA. Uzyskane wyniki sugerują, że hDicer mogłaby uczestniczyć w procesie degradacji nici pasażerskiej uwalnianej z dupleksu miRNA podczas tworzenia aktywnego kompleksu RISC.
2. hDicer posiada potencjał do hydrolizy substratów typu DNA. Przypuszczalnie dostęp substratów DNA do domen RNazowych hDicer jest ograniczony przez domeny otaczające centrum katalityczne enzymu, takie jak domena DUF283 lub PAZ.
3. Naturalnie występujący w komórkach skrócony wariant hDicer — Dicer1e, posiadający unikatowy koniec N oraz zaledwie trzy domeny: RNazy IIIa, RNazy IIIb oraz dsRBD, nie generuje produktów o długości miRNA/siRNA. Wariant ten może jednak hydrolizować krótkie RNA, co w połączeniu z analizą danych transkryptomicznych dotyczących komórek produkujących wariant Dicer1e może wskazywać, iż wariant ten jest zaangażowany w metabolizm komórkowych RNA.
4. Wariant Dicer1e posiada potencjał do hydrolizy substratów typu DNA. Na obecnym etapie badań trudno jednak powiedzieć, czy i gdzie taka aktywność DNazowa mogłaby być wykorzystywana w komórkach. Bez wątpienia konieczne są dalsze badania mające na celu zdefiniowanie puli komórkowych DNA, z którymi może oddziaływać hDicer i jej skrócone formy.
5. Zgromadzone dane pochodzące z analizy różnicowej poziomu ekspresji genów w komórkach produkujących i nieprodukujących Dicer1e sugerują, iż nadprodukcja Dicer1e może wpływać na zwiększenie proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych poprzez: (i) podwyższenie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces replikacji i organizacji DNA oraz (ii) obniżenie ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za połączenia międzykomórkowe.

8. Załącznik

Wersja elektroniczna prezentowanej rozprawy doktorskiej zawiera wyniki analiz bioinformatycznych w postaci Załącznika nr 1 (plik w formacie .xlsx).

Załącznik nr 1 zawiera:

Tabela S1. Zestawienie wspólnych genów ulegających podwyższonej ekspresji warunkowanej produkcją wariantu Dicer1e w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice.

Tabela S2. Zestawienie wspólnych genów ulegających obniżonej ekspresji warunkowanej produkcją wariantu Dicer1e w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice.

Tabela S3. Wykaz kategorii GO genów ulegających podwyższonej ekspresji warunkowanej produkcją wariantu Dicer1e w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice.

Tabela S4. Wykaz kategorii GO genów ulegających obniżonej ekspresji warunkowanej produkcją wariantu Dicer1e w komórkach HEK293T oraz HEK293T No_Dice.

9. Literatura

1. Pertea M: **The human transcriptome: an unfinished story.** *Genes (Basel)* 2012, **3**:344-360.
2. Mattick JS: **Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity.** *EMBO Rep* 2001, **2**:986-991.
3. Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, Mione M, Carninci P, d'Adda di Fagagna F: **Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response.** *Nature* 2012, **488**:231-235.
4. Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H: **PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions.** *Annu Rev Biochem* 2015, **84**:405-433.
5. Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J: **Noncoding regulatory RNAs database.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:429-431.
6. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:2999-3004.
7. Filipowicz W: **RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine.** *Cell* 2005, **122**:17-20.
8. Pratt AJ, MacRae IJ: **The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine.** *J Biol Chem* 2009, **284**:17897-17901.
9. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806-811.
10. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 2001, **409**:363-366.
11. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC: **Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing.** *Cell* 2001, **106**:23-34.
12. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA: **Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi.** *Science* 2002, **297**:1833-1837.
13. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA: **Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena.** *Cell* 2002, **110**:689-699.
14. Baulcombe D: **Viral suppression of systemic silencing.** *Trends Microbiol* 2002, **10**:306-308.
15. Kurzynska-Kokorniak A, Jackowiak P, Figlerowicz M, Figlerowicz M: **Human- and virus-encoded microRNAs as potential targets of antiviral therapy.** *Mini Rev Med Chem* 2009, **9**:927-937.
16. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res* 2009, **19**:92-105.
17. Zhang W, Liu J, Wang G: **The role of microRNAs in human breast cancer progression.** *Tumour Biol* 2014, **35**:6235-6244.
18. Tan L, Yu JT, Tan L: **Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases.** *Mol Neurobiol* 2015, **51**:1249-1262.
19. Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, Siasos G, Briasoulis A, Vogiatzi G, Kampoli AM, Tsiamis E, Tentolouris C, Stefanadis C: **The role of microRNAs in cardiovascular disease.** *Curr Med Chem* 2012, **19**:2605-2610.
20. Czech B, Hannon GJ: **Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**:19-31.
21. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C: **Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018, **9**:402.
22. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 2004, **23**:4051-4060.
23. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC: **The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*.** *Cell* 2007, **130**:89-100.

24. Lee S, Jee D, Srivastava S, Yang A, Ramidi A, Shang R, Bortolamiol-Becet D, Pfeffer S, Gu S, Wen J, Lai EC: **Promiscuous splicing-derived hairpins are dominant substrates of tailing-mediated defense of miRNA biogenesis in mammals.** *Cell Rep* 2023, **42**:112111.
25. Nguyen TA, Jo MH, Choi YG, Park J, Kwon SC, Hohng S, Kim VN, Woo JS: **Functional Anatomy of the Human Microprocessor.** *Cell* 2015, **161**:1374-1387.
26. Senturia R, Faller M, Yin S, Loo JA, Cascio D, Sawaya MR, Hwang D, Clubb RT, Guo F: **Structure of the dimerization domain of DiGeorge critical region 8.** *Protein Sci* 2010, **19**:1354-1365.
27. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W: **Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III.** *Cell* 2004, **118**:57-68.
28. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA: **Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer.** *Science* 2006, **311**:195-198.
29. Dykxhoorn DM, Lieberman J: **The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic.** *Annu Rev Med* 2005, **56**:401-423.
30. Lee YY, Kim H, Kim VN: **Sequence determinant of small RNA production by DICER.** *Nature* 2023, **615**:323-330.
31. Paradis F, Vigneault C, Robert C, Sirard MA: **RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes.** *Mol Reprod Dev* 2005, **70**:111-121.
32. Anger M, Klima J, Kubelka M, Prochazka R, Motlik J, Schultz RM: **Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation.** *Mol Reprod Dev* 2004, **69**:11-16.
33. Yan Z MY, Liu Dj, Cang M, Wang R, Bao S: **Targeted Suppression of Connexin 43 in Ovine Preimplantation Embryos by RNA Interference Using Long Double-stranded RNA.** *Asian-Australas J Anim Sci* 2010, **23**:456-464.
34. Bouche N, Laressergues D, Gascioli V, Vaucheret H: **An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs.** *EMBO J* 2006, **25**:3347-3356.
35. Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O: **Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense.** *Science* 2006, **313**:68-71.
36. Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler JL: **Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila.** *Nat Immunol* 2006, **7**:590-597.
37. Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, Mower JP, Wolfe KH, Fink GR, Bartel DP: **RNAi in budding yeast.** *Science* 2009, **326**:544-550.
38. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R: **Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs.** *Genes Dev* 2008, **22**:2773-2785.
39. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, et al: **Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes.** *Nature* 2008, **453**:539-543.
40. Svoboda P: **Renaissance of mammalian endogenous RNAi.** *FEBS Lett* 2014, **588**:2550-2556.
41. Okamura K, Lai EC: **Endogenous small interfering RNAs in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:673-678.
42. Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ: **Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes.** *Nature* 2008, **453**:534-538.
43. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R: **TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.** *Nature* 2005, **436**:740-744.
44. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA: **In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:512-517.
45. Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E: **Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**:1148-1153.

46. Landthaler M, Gaidatzis D, Rothballer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, Ojo T, Hafner M, Zavolan M, Tuschl T: **Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs.** *RNA* 2008, **14**:2580-2596.
47. Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T: **Identification of novel argonaute-associated proteins.** *Curr Biol* 2005, **15**:2149-2155.
48. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R: **MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6.** *Nature* 2007, **447**:823-828.
49. Robb GB, Rana TM: **RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading.** *Mol Cell* 2007, **26**:523-537.
50. Hammond SM: **Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway.** *FEBS Lett* 2005, **579**:5822-5829.
51. Olsen PH, Ambros V: **The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.** *Dev Biol* 1999, **216**:671-680.
52. Stroynowska-Czerwinska A, Fiszer A, Krzyzosiak WJ: **The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells.** *Cell Mol Life Sci* 2014, **71**:2253-2270.
53. Iorio MV, Croce CM: **Causes and consequences of microRNA dysregulation.** *Cancer J* 2012, **18**:215-222.
54. Meister G, Tuschl T: **Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.** *Nature* 2004, **431**:343-349.
55. Kim VN: **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:376-385.
56. Djuranovic S, Nahvi A, Green R: **A parsimonious model for gene regulation by miRNAs.** *Science* 2011, **331**:550-553.
57. Macfarlane LA, Murphy PR: **MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.** *Curr Genomics* 2010, **11**:537-561.
58. Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L: **The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes.** *Nat Struct Biol* 2003, **10**:1026-1032.
59. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T: **Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs.** *Mol Cell* 2004, **15**:185-197.
60. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ: **Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.** *Science* 2004, **305**:1437-1441.
61. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T: **Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate.** *EMBO J* 2001, **20**:6877-6888.
62. Jonas S, Izaurralde E: **Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing.** *Nat Rev Genet* 2015, **16**:421-433.
63. Niaz S: **The AGO proteins: an overview.** *Biol Chem* 2018, **399**:525-547.
64. Dueck A, Meister G: **Assembly and function of small RNA - argonaute protein complexes.** *Biol Chem* 2014, **395**:611-629.
65. Macrae IJ, Li F, Zhou K, Cande WZ, Doudna JA: **Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006, **71**:73-80.
66. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W: **Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP.** *EMBO J* 2002, **21**:5875-5885.
67. Bogerd HP, Whisnant AW, Kennedy EM, Flores O, Cullen BR: **Derivation and characterization of Dicer- and microRNA-deficient human cells.** *RNA* 2014, **20**:923-937.
68. Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA, Wang H-W: **Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer.** *Nature structural & molecular biology* 2013, **20**:662-670.

69. Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ: **The molecular architecture of human Dicer.** *Nat Struct Mol Biol* 2012, **19**:436-440.
70. Lau PW, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ: **Structure of the human Dicer-TRBP complex by electron microscopy.** *Structure* 2009, **17**:1326-1332.
71. Liu Z, Wang J, Li G, Wang HW: **Structure of precursor microRNA's terminal loop regulates human Dicer's dicing activity by switching DExH/D domain.** *Protein Cell* 2014.
72. Zapletal D, Taborska E, Pasulka J, Malik R, Kubicek K, Zanova M, Much C, Sebesta M, Buccheri V, Horvat F, et al: **Structural and functional basis of mammalian microRNA biogenesis by Dicer.** *Mol Cell* 2022, **82**:4064-4079 e4013.
73. Lee YY, Lee H, Kim H, Kim VN, Roh SH: **Structure of the human DICER-pre-miRNA complex in a dicing state.** *Nature* 2023, **615**:331-338.
74. Liu Z, Wang J, Cheng H, Ke X, Sun L, Zhang QC, Wang H-W: **Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate.** *Cell* 2018, **173**:1191-1203.e1112.
75. Li HL, Chelladurai BS, Zhang K, Nicholson AW: **Ribonuclease III cleavage of a bacteriophage T7 processing signal. Divalent cation specificity, and specific anion effects.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**:1919-1925.
76. Dunn JJ: **RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage.** *J Biol Chem* 1976, **251**:3807-3814.
77. Robertson HD, Webster RE, Zinder ND: **Purification and properties of ribonuclease III from Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1968, **243**:82-91.
78. Takeshita D, Zenno S, Lee WC, Nagata K, Saigo K, Tanokura M: **Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer.** *J Mol Biol* 2007, **374**:106-120.
79. Tyczewska A, Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Szopa A, Kietrys AM, Wrzesinski J, Twardowski T, Figlerowicz M: **Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human dicer activity in vitro.** *Nucleic Acid Ther* 2011, **21**:333-346.
80. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M: **A New Short Oligonucleotide-Based Strategy for the Precursor-Specific Regulation of microRNA Processing by Dicer.** *PLoS One* 2013, **8**:e77703.
81. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM: **Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain.** *Nature* 2003, **426**:468-474.
82. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M: **Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain.** *Nature* 2003, **426**:465-469.
83. Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN: **Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing.** *Nature* 2011, **475**:201-205.
84. Tian Y, Simanshu DK, Ma JB, Park JE, Heo I, Kim VN, Patel DJ: **A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer.** *Mol Cell* 2014, **53**:606-616.
85. MacRae IJ, Doudna JA: **Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes.** *Curr Opin Struct Biol* 2007, **17**:138-145.
86. Mickiewicz A, Sarzynska J, Milostan M, Kurzynska-Kokorniak A, Rybarczyk A, Lukasiak P, Kulinski T, Figlerowicz M, Blazewicz J: **Modeling of the catalytic core of Arabidopsis thaliana Dicer-like 4 protein and its complex with double-stranded RNA.** *Comput Biol Chem* 2017, **66**:44-56.
87. Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST: **Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing.** *J Biol Chem* 2000, **275**:36957-36965.
88. Burgers PMJ, Kunkel TA: **Eukaryotic DNA Replication Fork.** *Annu Rev Biochem* 2017, **86**:417-438.
89. Wostenberg C, Lary JW, Sahu D, Acevedo R, Quarles KA, Cole JL, Showalter SA: **The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs.** *PLoS One* 2012, **7**:e51829.
90. Ma E, Zhou K, Kidwell MA, Doudna JA: **Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing.** *J Mol Biol* 2012, **422**:466-476.

91. Bennisser Y, Jeang KT: **HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA.** *Retrovirology* 2006, **3**:95.
92. Daniels SM, Melendez-Pena CE, Scarborough RJ, Daher A, Christensen HS, El Far M, Purcell DF, Laine S, Gatignol A: **Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference.** *BMC Mol Biol* 2009, **10**:38.
93. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA: **Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis.** *Mol Cell* 2015, **57**:397-407.
94. Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA: **Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing.** *Nucleic Acids Res* 2013.
95. Fukunaga R, Han BW, Hung JH, Xu J, Weng Z, Zamore PD: **Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals.** *Cell* 2012, **151**:533-546.
96. Chakravarthy S, Sternberg SH, Kellenberger CA, Doudna JA: **Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing.** *J Mol Biol* 2010, **404**:392-402.
97. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W: **TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing.** *EMBO Rep* 2005, **6**:961-967.
98. Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA: **Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain.** *J Mol Biol* 2008, **380**:237-243.
99. Kurzynska-Kokorniak A, Pokornowska M, Koralewska N, Hoffmann W, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M: **Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro.** *Sci Rep* 2016, **6**:23989.
100. Szczepanska A, Wojnicka M, Kurzynska-Kokorniak A: **The Significance of the DUF283 Domain for the Activity of Human Ribonuclease Dicer.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**.
101. Dincbas-Renqvist V, Pepin G, Rakonjac M, Plante I, Ouellet DL, Hermansson A, Goulet I, Doucet J, Samuelsson B, Radmark O, Provost P: **Human Dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1789**:99-108.
102. Ahmad S, Hur S: **Helicases in Antiviral Immunity: Dual Properties as Sensors and Effectors.** *Trends Biochem Sci* 2015, **40**:576-585.
103. Rybak-Wolf A, Jens M, Murakawa Y, Herzog M, Landthaler M, Rajewsky N: **A Variety of Dicer Substrates in Human and C-elegans.** *Cell* 2014, **159**:1153-1167.
104. Koralewska N, Hoffmann W, Pokornowska M, Milewski M, Lipinska A, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M, Kurzynska-Kokorniak A: **How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing.** *Acta Biochim Pol* 2016, **63**:773-783.
105. Lu S, Cullen BR: **Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis.** *J Virol* 2004, **78**:12868-12876.
106. Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G: **Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA.** *J Virol* 2005, **79**:9556-9565.
107. Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, Foulds CE, Stuart LM, Barker A, Russell VJ, et al: **RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:6536-6541.
108. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Filipowicz W, Svoboda P: **Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells.** *PLoS One* 2010, **5**:e12175.
109. Tan Y, Zhang B, Wu T, Skogerbo G, Zhu X, Guo X, He S, Chen R: **Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells.** *BMC Mol Biol* 2009, **10**:12.
110. Gagnon KT, Li L, Chu Y, Janowski BA, Corey DR: **RNAi factors are present and active in human cell nuclei.** *Cell Rep* 2014, **6**:211-221.
111. Burger K, Schlackow M, Potts M, Hester S, Mohammed S, Gullerova M: **Nuclear phosphorylated Dicer processes double-stranded RNA in response to DNA damage.** *J Cell Biol* 2017, **216**:2373-2389.
112. Tang KF, Ren H: **The role of dicer in DNA damage repair.** *Int J Mol Sci* 2012, **13**:16769-16778.

113. White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M: **Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA.** *Nat Struct Mol Biol* 2014, **21**:552-559.
114. Reyes-Turcu FE, Grewal SI: **Different means, same end-heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast.** *Curr Opin Genet Dev* 2012, **22**:156-163.
115. Chitale S, Richly H: **DICER and ZRF1 contribute to chromatin decondensation during nucleotide excision repair.** *Nucleic Acids Res* 2017, **45**:5901-5912.
116. Yadav RP, Makela JA, Hyssala H, Cisneros-Montalvo S, Kotaja N: **DICER regulates the expression of major satellite repeat transcripts and meiotic chromosome segregation during spermatogenesis.** *Nucleic Acids Res* 2020, **48**:7135-7153.
117. Doyle M, Badertscher L, Jaskiewicz L, Guttinger S, Jurado S, Hugenschmidt T, Kutay U, Filipowicz W: **The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal.** *RNA* 2013, **19**:1238-1252.
118. Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, Ladbury JE, Fire AZ, Skeath JB, Arur S: **A Requirement for ERK-Dependent Dicer Phosphorylation in Coordinating Oocyte-to-Embryo Transition in *C. elegans*.** *Dev Cell* 2014, **31**:614-628.
119. Arur S, Ohmachi M, Nayak S, Hayes M, Miranda A, Hay A, Golden A, Schedl T: **Multiple ERK substrates execute single biological processes in *Caenorhabditis elegans* germ-line development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:4776-4781.
120. Flemr M, Malik R, Franke V, Nejepinska J, Sedlacek R, Vlahovicek K, Svoboda P: **A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes.** *Cell* 2013, **155**:807-816.
121. Poirier EZ, Buck MD, Chakravarty P, Carvalho J, Frederico B, Cardoso A, Healy L, Ulferts R, Beale R, Reis e Sousa C: **An isoform of Dicer protects mammalian stem cells against multiple RNA viruses.** *Science* 2021, **373**:231-236.
122. Potenza N, Papa U, Scaruffi P, Mosca N, Tonini GP, Russo A: **A novel splice variant of the human dicer gene is expressed in neuroblastoma cells.** *FEBS Lett* 2010, **584**:3452-3457.
123. Mosca N, Starega-Roslan J, Castiello F, Russo A, Krzyzosiak WJ, Potenza N: **Characterization of a naturally occurring truncated Dicer.** *Mol Biol Rep* 2015, **42**:1333-1340.
124. Hinkal GW, Grelier G, Puisieux A, Moyret-Lalle C: **Complexity in the regulation of Dicer expression: Dicer variant proteins are differentially expressed in epithelial and mesenchymal breast cancer cells and decreased during EMT.** *Br J Cancer* 2011, **104**:387-388.
125. Cantini LP, Andino LM, Attaway CC, Butler B, Dumitriu A, Blackshaw A, Jakymiw A: **Identification and characterization of Dicer1e, a Dicer1 protein variant, in oral cancer cells.** *Mol Cancer* 2014, **13**:190.
126. Sawh AN, Duchaine TF: **A truncated form of dicer tilts the balance of RNA interference pathways.** *Cell Rep* 2013, **4**:454-463.
127. Lv X, Wang W, Zhao Q, Qiao X, Wang L, Yan Y, Han S, Liu Z, Wang L, Song L: **A truncated intracellular Dicer-like molecule involves in antiviral immune recognition of oyster *Crassostrea gigas*.** *Dev Comp Immunol* 2021, **116**:103931.
128. Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D: **Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease.** *Science* 2010, **328**:327-334.
129. Ge X, Zhao X, Nakagawa A, Gong X, Skeen-Gaar RR, Shi Y, Gong H, Wang X, Xue D: **A novel mechanism underlies caspase-dependent conversion of the dicer ribonuclease into a deoxyribonuclease during apoptosis.** *Cell Res* 2014, **24**:218-232.
130. Matskevich AA, Moelling K: **Stimuli-dependent cleavage of Dicer during apoptosis.** *Biochem J* 2008, **412**:527-534.
131. Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR, Kim VN: **The role of PACT in the RNA silencing pathway.** *The EMBO Journal* 2006, **25**:522-532.
132. Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A, Sharp PA: **In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs.** *RNA* 2012, **18**:1116-1122.

133. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA: **Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3957-3958.
134. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
135. Kim D, Langmead B, Salzberg SL: **HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements.** *Nat Methods* 2015, **12**:357-360.
136. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK: **edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.** *Bioinformatics* 2010, **26**:139-140.
137. Rohart F, Gautier B, Singh A, Le Cao KA: **mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration.** *PLoS Comput Biol* 2017, **13**:e1005752.
138. Grote S: **GOfuncR: Gene ontology enrichment using FUNC.** . In Bioconductor; 2023.
139. Belmokhtar CA, Hillion J, Segal-Bendirdjian E: **Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms.** *Oncogene* 2001, **20**:3354-3362.
140. Thuret G, Chiquet C, Herrag S, Dumollard JM, Boudard D, Bednarz J, Campos L, Gain P: **Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line.** *Br J Ophthalmol* 2003, **87**:346-352.
141. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, Yamada S, Negi S, Bu X, Kato J, et al: **The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis.** *J Biol Chem* 2021, **296**:100046.
142. Wojnicka M, Szczepanska A, Kurzynska-Kokorniak A: **Unknown Areas of Activity of Human Ribonuclease Dicer: A Putative Deoxyribonuclease Activity.** *Molecules* 2020, **25**.
143. Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, Khvorova A: **The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency.** *RNA* 2005, **11**:674-682.
144. Provost P, Dishart D, Doucet J, Friendewey D, Samuelsson B, Radmark O: **Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer.** *EMBO J* 2002, **21**:5864-5874.
145. Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, Masutomi K, Hayashizaki Y: **Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER.** *BMC Mol Biol* 2011, **12**:6.
146. Bouvette J, Korkut DN, Fouillen A, Amellah S, Nanci A, Durocher Y, Omichinski JG, Legault P: **High-yield production of human Dicer by transfection of human HEK293-EBNA1 cells grown in suspension.** *BMC Biotechnol* 2018, **18**:76.
147. De Mattos JC, Dantas FJ, Caldeira-de-Araujo A, Moraes MO: **Agarose gel electrophoresis system in the classroom: Detection of DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology.** *Biochem Mol Biol Educ* 2004, **32**:254-257.
148. Burkard TR, Planyavsky M, Kaupé I, Breitwieser FP, Burckstummer T, Bennett KL, Superti-Furga G, Colinge J: **Initial characterization of the human central proteome.** *BMC Syst Biol* 2011, **5**:17.
149. Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J: **AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation.** *Genome Biol* 2006, **7 Suppl 1**:S12 11-14.
150. Grelier G, Voirin N, Ay AS, Cox DG, Chabaud S, Treilleux I, Leon-Goddard S, Rimokh R, Mikaelian I, Venoux C, et al: **Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype.** *Br J Cancer* 2009, **101**:673-683.
151. Ewing B, Green P: **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.** *Genome Res* 1998, **8**:186-194.
152. Team RC: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ; 2021.
153. Sun W, Pertzev A, Nicholson AW: **Catalytic mechanism of Escherichia coli ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:807-815.
154. Gan J, Shaw G, Tropea JE, Waugh DS, Court DL, Ji X: **A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III.** *Mol Microbiol* 2008, **67**:143-154.

155. Gan J, Tropea JE, Austin BP, Court DL, Waugh DS, Ji X: **Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III.** *Cell* 2006, **124**:355-366.
156. Drusin SI, Rasia RM, Moreno DM: **Study of the role of Mg(2+) in dsRNA processing mechanism by bacterial RNase III through QM/MM simulations.** *J Biol Inorg Chem* 2020, **25**:89-98.
157. Valli AA, Santos BA, Hnatova S, Bassett AR, Molnar A, Chung BY, Baulcombe DC: **Most microRNAs in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii* are produced by Dicer-like 3-mediated cleavage of introns and untranslated regions of coding RNAs.** *Genome Res* 2016, **26**:519-529.
158. Feng Y, Zhang X, Song Q, Li T, Zeng Y: **Drosha processing controls the specificity and efficiency of global microRNA expression.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1809**:700-707.
159. Tahbaz N, Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W, Hobman TC: **Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer.** *EMBO Rep* 2004, **5**:189-194.
160. Lima WF, Murray H, Nichols JG, Wu H, Sun H, Prakash TP, Berdeja AR, Gaus HJ, Crooke ST: **Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity and interacts with different regions of the nucleic acids.** *J Biol Chem* 2009, **284**:2535-2548.
161. Plante I, Ple H, Landry P, Gunaratne PH, Provost P: **Modulation of microRNA Activity by Semi-microRNAs.** *Front Genet* 2012, **3**:99.
162. Krall JB, Nichols PJ, Henen MA, Vicens Q, Vogeli B: **Structure and Formation of Z-DNA and Z-RNA.** *Molecules* 2023, **28**.
163. Lamontagne B, Hannoush RN, Damha MJ, Abou Elela S: **Molecular requirements for duplex recognition and cleavage by eukaryotic RNase III: discovery of an RNA-dependent DNA cleavage activity of yeast Rnt1p.** *J Mol Biol* 2004, **338**:401-418.
164. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T, Patel DJ: **Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes.** *Nature* 2009, **461**:754-761.
165. Ando Y, Tomaru Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kawaji H, Kubosaki A, Kimura R, Tagata M, Ino Y, Hirano H, et al: **Nuclear pore complex protein mediated nuclear localization of dicer protein in human cells.** *PLoS One* 2011, **6**:e23385.
166. Francia S, Cabrini M, Matti V, Oldani A, d'Adda di Fagagna F: **DICER, DROSHA and DNA damage-response RNAs are necessary for the secondary recruitment of DNA damage response factors.** *J Cell Sci* 2016.
167. Rossiello F, Aguado J, Sepe S, Iannelli F, Nguyen Q, Pitchiaya S, Carninci P, d'Adda di Fagagna F: **DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs.** *Nat Commun* 2017, **8**:13980.
168. Wang Q, Goldstein M: **Small RNAs Recruit Chromatin-Modifying Enzymes MMSET and Tip60 to Reconfigure Damaged DNA upon Double-Strand Break and Facilitate Repair.** *Cancer Res* 2016, **76**:1904-1915.
169. Gao M, Wei W, Li MM, Wu YS, Ba Z, Jin KX, Li MM, Liao YQ, Adhikari S, Chong Z, et al: **Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination.** *Cell Res* 2014, **24**:532-541.
170. Samejima K, Earnshaw WC: **Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:677-688.
171. Parrish JZ, Xue D: **Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development.** *Chromosoma* 2006, **115**:89-97.
172. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, Figlerowicz M: **The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**:4365-4380.
173. Canovas-Marquez JT, Falk S, Nicolas FE, Padmanabhan S, Zapata-Perez R, Sanchez-Ferrer A, Navarro E, Garre V: **A ribonuclease III involved in virulence of Mucorales fungi has evolved to cut exclusively single-stranded RNA.** *Nucleic Acids Res* 2021, **49**:5294-5307.

174. Nicholson P, Muller B: **Post-transcriptional control of animal histone gene expression--not so different after all.** *Mol Biosyst* 2008, **4**:721-725.
175. Rattray AM, Muller B: **The control of histone gene expression.** *Biochem Soc Trans* 2012, **40**:880-885.
176. Singh RK, Liang D, Gajjalaiahvari UR, Kabbaj MH, Paik J, Gunjan A: **Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms.** *Cell Cycle* 2010, **9**:4236-4244.
177. Mei Q, Huang J, Chen W, Tang J, Xu C, Yu Q, Cheng Y, Ma L, Yu X, Li S: **Regulation of DNA replication-coupled histone gene expression.** *Oncotarget* 2017, **8**:95005-95022.
178. McIntosh JR: **Mitosis.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016, **8**.
179. Tan EP, Duncan FE, Slawson C: **The sweet side of the cell cycle.** *Biochem Soc Trans* 2017, **45**:313-322.
180. Ong JY, Torres JZ: **Dissecting the mechanisms of cell division.** *J Biol Chem* 2019, **294**:11382-11390.
181. Gunesdogan U, Jackle H, Herzig A: **Histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression.** *Elife* 2014, **3**:e02443.
182. Tracey A, Martin LY, Andrew J, Sanders, Jane Lane, and Wen G. Jiang: **Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective.** In *Metastatic Cancer Clinical Biological Perspectives*. Edited by R J: Landes Bioscience; 2013: 135-168
183. Gkretsi V, Stylianopoulos T: **Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis.** *Front Oncol* 2018, **8**:145.