

# Tytuł pracy: **Wybrane aspekty oddziaływań pomiędzy ludzką rybonukleazą Dicer i cząsteczkami kwasów nukleinowych**

Autor: Agnieszka Szczepańska

## **Streszczenie**

Rybonukleazy Dicer należą do rodziny rybonukleaz III (RNaz III), będących endorybonukleazami specyficznymi wobec dwuniciowych RNA (dsRNA). Dicer znane są głównie z ich kluczowej roli w procesie biogenezy małych regulatorowych RNA (srRNA): mikroRNA (miRNA) oraz małych interferujących RNA (siRNA). W ostatnim czasie pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych opisujących aktywności Dicer niepowiązane z jej aktywnością RNazową i produkcją srRNA. Niniejsza praca doktorska poświęcona jest rybonukleazie Dicer człowieka (hDicer). hDicer, podobnie jak inne Dicer kręgowców, jest białkiem wielodomenowym i złożona jest z N-końcowej domeny helikazowej, domeny DUF283 (ang. domain of unknown function), domeny Platformy i PAZ, helisy łączącej, dwóch domen RNazowych (RIIIa i RIIIb) oraz C-końcowej domeny wiążącej dsRNA (dsRBD). Domeny: Platforma i PAZ wraz z helisą łączącą są często określane jako kasetta PPC (ang. Platform-PAZ-Connector helix). Kasetta PPC odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu i kotwiczeniu kanonicznych substratów Dicer, czyli prekursorów miRNA (pre-miRNA) i prekursorów siRNA (pre-siRNA).

Wcześniejsze badania prowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN wykazały, iż domena DUF283 hDicer wiąże jednoniciowe RNA i DNA, nie wiąże natomiast dwuniciowych RNA i DNA. Co ciekawe, dalsze badania wykazały, iż DUF283 może wspierać proces parowania cząsteczek kwasów nukleinowych. Kolejne analizy ujawniły, że hDicer pełnej długości również wykazuje taką aktywność, działając tym samym jak białka typu ang. nucleic acid annealer (białka wspierające hybrydyzację komplementarnych kwasów nukleinowych). W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań postawiono hipotezę, że domena DUF283 jest istotna dla aktywności hDicer wspierającej parowanie cząsteczek kwasów nukleinowych. W celu weryfikacji tej hipotezy stworzono warianty delecyjne hDicer pozbawione sekwencji aminokwasowej kodującej domenę DUF283: (i) wariant  $\Delta$ DUF(630-709) oraz (ii) wariant  $\Delta$ DUF(625-752). Wariant  $\Delta$ DUF(625-752), oprócz delecji domeny DUF283, pozbawiony był także fragmentów oskrzydlających tę domenę. Przeprowadzone analizy wykazały, iż w warunkach *in vitro* wariant  $\Delta$ DUF(630-709) prezentował podobną aktywność RNazową wobec użytych w badaniach pre-miRNA i pre-siRNA, co hDicer (białko typu dzikiego). Natomiast wariant  $\Delta$ DUF(625-752), wobec tych samych substratów, wykazywał zdecydowanie słabszą aktywność RNazową. W przypadku badań *in cellulo*, wariant  $\Delta$ DUF(625-752) również produkował wybrane miRNA z niższą wydajnością, w porównaniu do wariantu  $\Delta$ DUF(630-709), czy hDicer. Co jednak ważne, oba warianty nie wykazywały aktywności wspierającej parowanie cząsteczek kwasów nukleinowych. Uzyskane dane wspierają hipotezę, że domena DUF283 jest kluczowa dla aktywności typu nucleic acid annealer hDicer.

Rybonukleazy Dicer mogą wiązać w komórkach nie tylko cząsteczki pre-miRNA oraz pre-siRNA, ale także mRNA, czy długie niekodujące RNA. Biorąc pod uwagę ten fakt, kolejnym celem badawczym było określenie roli domeny DUF283 hDicer w wiązaniu puli komórkowych

RNA. W badaniach tych wykorzystano metodę irCLIP-seq (ang. infrared crosslinking immunoprecipitation followed by NGS sequencing) oraz ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK 293T), a także pochodne linie komórkowe typu DICER1 knock-out, produkujące: (i) wariant  $\Delta$ DUF(630-709), (ii) wariant  $\Delta$ DUF(625-752) lub (iii) hDicer typu dzikiego (tzw. rescue control). Przeprowadzone badania wykazały, że poszczególne warianty delecyjne hDicer wiążą inne pule RNA w komórkach HEK 293T, inna była także pula RNA wiązanych przez hDicer. Zgromadzone wyniki pozwalają sądzić, iż domena DUF283 hDicer bierze udział w rozpoznawaniu i wiązaniu określonej puli komórkowych RNA. Co ciekawe, zgromadzone dane ujawniły, że w puli RNA wiązanych przez hDicer znajdują się RNA bogate w ciągi guanozynowe (G). Analizy bioinformatyczne wykazały, iż większość z tych RNA posiada potencjał do tworzenia struktur G-kwadrupleksu. Otrzymane dane wytyczyły kolejny cel badań, który dotyczył oddziaływań hDicer z cząsteczkami RNA i DNA przyjmującymi struktury G-kwadrupleksu. Przeprowadzone badania wykazały, iż hDicer wiąże zarówno G-kwadrupleksy RNA (G4-RNA), jak i DNA (G4-DNA), a ich wiązanie odbywa się najprawdopodobniej w obrębie kasety PPC hDicer. W oparciu o przeprowadzone modelowania molekularne postawiono hipotezę, że cząsteczki pre-miRNA i cząsteczki przyjmujące strukturę G-kwadrupleksu kotwiczone są w tym samym rejonie kasety PPC hDicer. Rzeczywiście, w wyniku dodania do mieszaniny reakcyjnej G4-RNA lub G4-DNA, obserwowano inhibicję cięcia pre-miRNA przez hDicer. Zdobyta wiedza poszerza zrozumienie molekularnych podstaw oddziaływań pomiędzy rybonukleazą Dicer oraz cząsteczkami RNA i DNA przyjmującymi struktury G-kwadrupleksu.

Podsumowując, wyniki badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej wspierają dotychczasowe obserwacje, że rola rybonukleaz Dicer może wykraczać daleko poza proces biogenezy srRNA.