

Załącznik nr 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

Anna Kurzyńska-Kokorniak

Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

Poznań, wrzesień 2016

I. IMIĘ I NAZWISKO

Anna Kurzyńska-Kokorniak

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

- Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu; 14 grudnia 2004 roku (*cum laude*)

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badania roli odwrotnej transkryptazy w generowaniu zmienności genetycznej wirusa HIV*”.

- Stopień magistra biologii w zakresie biologii molekularnej

Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, biologia molekularna (1999). Tytuł pracy magisterskiej: „*Indukcja syntezy genu syntazy ACCII w *Lycopodium obscurum* przy pomocy inhibitora białkowego cykloheksimidu*”.

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.

- **od 02.2007:** Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (adiunkt od 04.2007)
- **04.2005 – 02.2007:** Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA (staż podoktorski)
- **10.1999 – 03.2005:** Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (studium doktoranckie/asystent)

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Rybonukleazy typu Dicer oraz czynniki zaangażowane w regulację ich aktywności ze szczególnym uwzględnieniem krótkich RNA

B. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. N. Koralewska, W. Hoffmann, M. Pokornowska, M.C. Milewski, A. Lipinska, K. Bienkowska-Szewczyk, M. Figlerowicz, **A. Kurzynska-Kokorniak[§]** (2016). *How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing*. Acta Biochim Pol. Epub: No. 2016_1339, Vol. 63, 2016. doi: 10.18388/abp.2016_1339.

IF (2014/2015) - 1.153/pkt MNIŚW- 15/ Cyt. WoS – 0

2. **A. Kurzynska-Kokorniak[§]**, M. Pokornowska, N. Koralewska, W. Hoffmann, K. Bienkowska-Szewczyk, M. Figlerowicz[§] (2016). *Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro*. Sci Rep. 2016 Apr 5;6:23989. doi: 10.1038/srep23989.

IF (2014/2015) - 5.578 /pkt. MNIŚW - 40/ Cyt. WoS – 0

3. A. Tworak, A. Urbanowicz, J. Podkowinski, **A. Kurzynska-Kokorniak**, N. Koralewska, M. Figlerowicz (2016). *Six Medicago truncatula Dicer-like protein genes are expressed in plant cells and upregulated in nodules*. Plant Cell Rep. 35(5):1043-52. doi: 10.1007/s00299-016-1936-8.

IF (2014/2015) - 3.071/ pkt. MNIŚW - 35/ Cyt. WoS – 0

4. **A. Kurzynska-Kokorniak**, N. Koralewska, M. Pokornowska, A. Urbanowicz, A. Tworak, A. Mickiewicz, M. Figlerowicz (2015). *The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities*. Nucleic Acids Res. 19;43(9):4365-80. doi: 10.1093/nar/gkv328.

IF(2015) - 9.112/ pkt. MNIŚW- 40/ Cyt. WoS – 8

5. **A. Kurzyńska-Kokorniak**, N. Koralewska, A. Tyczewska, T. Twardowski, M. Figlerowicz (2013). *A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer*. PLoS One 8(10):e77703, DOI 10.1371/journal.pone.0077703.

IF (2013) - 3.534/ pkt. MNiSW- 40/ Cyt. WoS – 4

6. A. Tyczewska*, **A. Kurzyńska-Kokorniak***, N. Koralewska, A. Szopa, A. M. Kietrys, J. Wrzesinski, T. Twardowski, M. Figlerowicz (2011). *Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro*. Nucleic Acid Ther. 21(5), 333-46.

IF (2011) 2.797/ pkt. MNiSW- 25/ Cyt. WoS – 3

* Autor równorzędny

§ Autor korespondencyjny

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **25.245**

Sumaryczny Impact Factor (IF) został obliczony na podstawie danych z Web of Science (WoS), zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji.

Patenty wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

7. M. Figlerowicz, A. Tworak, J. Podkowinski, N. Koralewska, **A. Kurzyńska-Kokorniak**

- Patent US (2015); numer patentu: WO2013006069-A1; PL395495-A1; EP2726619-A1; US2014186895-A1; US9051559-B2

Peptide with the enzymatic activity of a Dicer-like protein, a method for preparing short RNA molecules, and use thereof

- Patent PL (2016); numer patentu: 221404

Peptyd o aktywności enzymatycznej białka typu Dicer i jego zastosowanie do produkcji krótkich cząsteczek RNA

Oświadczenia habilitanta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku nr 5, natomiast kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe znajdują się w Załączniku nr 6.

C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Prace wchodzące w skład przedłożonego osiągnięcia naukowego dotyczą rybonukleaz typu Dicer oraz czynników zaangażowanych w regulację ich aktywności, w szczególności krótkich cząsteczek RNA. Głównym obiektem prowadzonych badań była ludzka rybonukleaza Dicer. Część zagadnień obejmuje również badania z udziałem Dicer pochodzącej z pierwotniaka *Giardia intestinalis* (Ogoniastek jelitowy) oraz roślinnych białek typu Dicer.

I. Problematyka

Pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące rybonukleazy Dicer pojawiły się w 2001 roku (Bernstein et al. 2001). Dicer została scharakteryzowana jako białko należące do rodziny Rybonukleaz III (RNaz III) - enzymów, które przeprowadzają specyficzny proces hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w obrębie dwuniciowych rejonów cząsteczek RNA. Wszystkie enzymy należące do tej rodziny charakteryzuje obecność jednej bądź dwóch domen rybonukleazowych, zwyczajowo nazywanych domeną RNazy III. Na skutek trawienia dwuniciowych RNA (dsRNA) przez RNazy III powstają specyficzne produkty posiadające grupę fosforanową na końcu 5' i dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (Zhang et al. 2004; Macrae et al. 2006; Macrae et al. 2006). Rybonukleaza Dicer najczęściej omawiana jest w kontekście procesu biogenezy krótkich regulatorowych RNA (ang. *small regulatory RNA*, srRNA), takich jak mikroRNA (miRNA) czy małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA). Podczas biogenezy miRNA Dicer wycina dupleksy, zawierające funkcjonalne miRNA, z prekursorów przyjmujących strukturę typu spinki do włosów, zwanych pre-miRNA. Substratami Dicer są również dsRNA, z których enzym uwalnia dupleksy siRNA. Powstające dupleksy miRNA/siRNA przenoszone są do kompleksu zwanego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*); dokładniej, są one wiązane przez białko z rodziny Argonaute (Ago), które wchodzi w skład kompleksu RISC. RISC jest głównym kompleksem efektorowym procesu wyciszania czy też wyłączania ekspresji genu przez dsRNA, leżącego u podstaw zjawiska interferencji RNA, RNAi (ang. *RNA interference*) (Hammond et al. 2000; Nykanen et al. 2001). Wyciszanie/wyłączanie ekspresji genu wymaga aktywacji kompleksu RISC. Proces ten polega na usunięciu z białka Ago jednej z nici dupleksu, podczas gdy

druga, zwana nicią wiodącą (ang. *guide strand*), pozostaje w kompleksie i służy jako sonda umożliwiająca specyficzne rozpoznawanie w pełni lub częściowo komplementarnych transkryptów (mRNA). Jeżeli transkrypt jest w pełni komplementarny do znajdującego się w RISC srRNA, wówczas mRNA zostaje przecięty przez białko Ago. W konsekwencji, w stosunkowo krótkim czasie cała pula mRNA może zostać zdegradowana i ma miejsce tzw. potranskrypcyjne wyciszenie genów (PTGS; ang. *posttranscriptional gene silencing*). Jeśli transkrypt jest tylko częściowo komplementarny do występującego w RISC srRNA, wówczas nie ulega on degradacji, a pozostaje jedynie związany z kompleksem białkowym, przez co nie może służyć jako matryca do syntezy białka. Dochodzi zatem do wyciszenia genu na poziomie translacji (TR ang. *translational repression*). Obecnie wiadomo, że cząsteczki srRNA, oprócz udziału w regulacji ekspresji genów, uczestniczą również w odpowiedzi organizmu na stres oraz w jego obronie przed patogenami (Berkhout and Haasnoot 2006; Friedman et al. 2009).

Jak wspomniałam na początku, większość prac wchodzących w skład przedłożonego osiągnięcia naukowego dotyczy Dicer pochodzącej z *Homo sapiens* (człowieka). Ludzka Dicer (ang. *human Dicer*, hDicer,) to wielodomenowe białko o masie ok. 220-kDa (1922 reszt aminokwasowych), zawierające kolejno, na końcu aminowym (końcu N) domenę helikazową, następnie domenę DUF283 (ang. *domain of unknown function*), domenę PAZ (ang. *Piwi-Argonaute-Zwille*), domeny RNazy III (IIIa oraz IIIb) i domenę wiążącą dsRNA, dsRBD (ang. *dsRNA binding domain*) (Zhang et al. 2004). W literaturze można również spotkać bardziej rozbudowany podział Dicer na domeny, w którym wyodrębniana jest także domena platformy (Lau et al. 2012). Domena platformy w strukturze pierwszorzędowej białka jest zlokalizowana pomiędzy domenami DUF283 i PAZ, natomiast w przypadku struktury trzeciorzędowej, domena ta znajduje się pomiędzy domenami PAZ i RNazy III (Lau et al. 2012).

Wyniki badań ewolucyjnych wskazują, że Dicer oraz jej homologi wykształciły się jedynie u organizmów eukariotycznych (Mukherjee et al. 2012). W bakteriach oraz archeonach, jak dotąd, nie zidentyfikowano genów kodujących Dicer. W przypadku bakterii znaleziono natomiast geny kodujące proste RNazy III posiadające jedną domenę RNazową oraz jedną domenę dsRBD (Lamontagne et al. 2001). Centrum aktywne RNaz III złożone jest z dwóch domen RNazowych, zatem proste RNazy, aby utworzyć aktywny enzym, muszą występować w postaci homo-dimeru (Zhang et al. 2004). Zgromadzone dane filogenetyczne

pozwalają sądzić, że gen kodujący przodka rybonukleazy Dicer ulegał powielaniu najprawdopodobniej podczas pojawiania się pierwszych organizmów wielokomórkowych. Uważa się ponadto, że rodzina genów kodujących Dicer podlegała różnicowaniu niezależnie w królestwie zwierząt, roślin oraz grzybów (Cerutti and Casas-Mollano 2006; Mukherjee et al. 2012). W królestwie zwierząt doszło do powstania dwóch genów kodujących odpowiednio, Dicer-1 oraz Dicer-2. Co ciekawe, u roślin powstały co najmniej cztery geny kodujące białka typu Dicer (Mukherjee et al. 2012). Roślinne rybonukleazy nazwane zostały białkami typu Dicer (ang. *Dicer-like proteins*, DCLs). Przypuszcza się również, że geny kodujące Dicer zostały utracone u niektórych pasożytniczych pierwotniaków (np. *Leishmania major* oraz *Trypanosoma cruzi*) oraz u niektórych grzybów (np. w modelowym organizmie – drożdżach piekarniczych, *Saccharomyces cerevisiae*, i w innych blisko spokrewnionych drożdżach) (Drinnenberg et al. 2011; Nicolas et al. 2013). Wnikliwe badania pozwoliły ustalić, że Dicer-1 rozpoznaje substraty pre-miRNA, natomiast Dicer-2, dsRNA. W konsekwencji, Dicer-1 jest odpowiedzialna za produkcję miRNA, a Dicer-2 bierze udział w tworzeniu siRNA (Lee et al. 2004). Dalsze badania ujawniły, że substratami Dicer-2 mogą być zarówno dsRNA pochodzenia komórkowego (endogennego) (Czech et al. 2008), jak i zewnątrzkomórkowego (egzogennego), np. wirusowe RNA (Galiana-Arnoux et al. 2006). Ze względu na udział Dicer-2 w wiązaniu i cięciu wirusowych RNA, rybonukleazy należące do tej grupy uważane są za ważny element odpowiedzi antywirusowej (Galiana-Arnoux et al. 2006). Co ciekawe, w przypadku organizmów, które wykształciły alternatywne ścieżki odpowiedzi antywirusowej, np. w przypadku kręgowców posiadających układ odpornościowy, jak dotąd nie zidentyfikowano genów kodujących Dicer-2 (Mukherjee et al. 2012). U roślin, posiadających kilka genów kodujących białka typu Dicer, wykształciły się natomiast rybonukleazy o bardziej wyspecjalizowanych funkcjach. DCL-1, podobnie jak Dicer-1, bierze udział w produkcji miRNA (głównie 21-nukleotydowych (nt)), natomiast białka DCL-2, DCL-3 oraz DCL-4 zaangażowane są w tworzenie różnego rodzaju siRNA (Xie et al. 2004). Dokładniej, rybonukleaza DCL-2 bierze udział w produkcji 22-nt siRNA wyciszających transgeny (Mlotshwa et al. 2008) oraz w odpowiedzi roślin na infekcje wirusowe (Bouche et al. 2006; Deleris et al. 2006). DCL-3, przecinając endogenne dsRNA, generuje 24-nt siRNA biorące udział w modyfikowaniu struktury chromatyny, a tym samym w regulacji ekspresji informacji genetycznej na poziomie DNA (Chan et al. 2004). DCL-4 zaangażowana jest natomiast w tworzenie 21-nt tzw. ta-siRNA (ang. *trans-acting siRNA*), czyli siRNA działających w układzie *trans*, które uczestniczą w degradacji mRNA innych niż

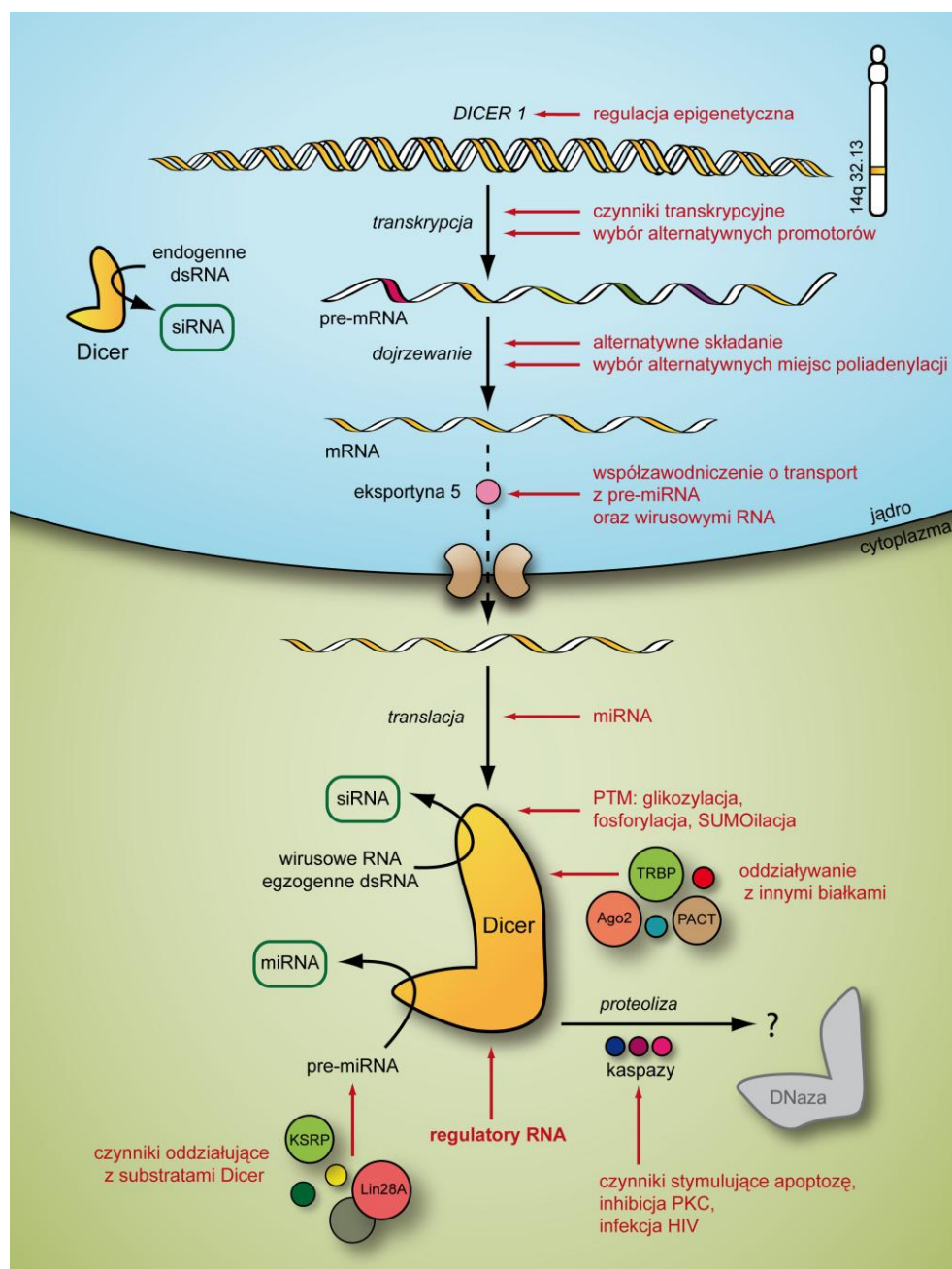
te, z których powstały (Allen et al. 2005; Gasciolli et al. 2005). DCL-4, podobnie jak DCL-2, bierze również udział w odpowiedzi przeciwwirusowej poprzez fragmentację wirusowych RNA (Bouche et al. 2006; Deleris et al. 2006).

W momencie rozpoczęcia niniejszych badań, w roku 2008, obowiązywał model działania rybonukleazy Dicer stworzony na podstawie badań grupy W. Filipowicza (Zhang et al. 2004) oraz grupy J. Doudna (Macrae et al. 2006). W. Filipowicz i wsp. ustalili, że rybonukleaza Dicer zawiera tylko jedno centrum aktywne, zbudowane z domen RNazy IIIa oraz RNazy IIIb. W centrum aktywnym enzymu dochodzi do cięcia obu nici RNA (Zhang et al. 2004). Wyniki badań biochemicznych wykazały ponadto, że domeny RNazy III działają niezależnie; mutacje reszt aminokwasowych w obrębie centrum katalitycznego jednej z domen RNazowych prowadziły do braku jej aktywności nukleazowej, nie wpływając na aktywność drugiej domeny i odwrotnie. Ponadto ustalono, że domena RNazy IIIa tnie nie RNA niosącą grupę 3'-OH, natomiast domena RNazy IIIb tnie nie posiadającą 5'-fosforan (Zhang et al. 2004). Zgodnie z zaprezentowanym modelem substraty Dicer, czyli cząsteczki pre-miRNA oraz dsRNA, wiązane były przez domenę PAZ. Wcześniejsze badania strukturalne dotyczące domeny PAZ pochodzącej z białek z rodziny Ago wykazały, że domena ta rozpoznaje i wiąże niesparowane nukleotydy na końcu 3' dupleksów RNA (Lingel et al. 2003; Song et al. 2003; Yan et al. 2003; Ma et al. 2004; Zhang et al. 2004). Ponadto, w przypadku obecnej w Dicer domeny dsRBD, stwierdzono, że pełni ona jedynie funkcję pomocniczą podczas rozpoznawania i wiązania substratów. Rola domeny helikazowej oraz DUF283 w procesie biogenezy srRNA pozostawała niewyjaśniona, choć pierwotnie zakładano, że domena helikazowa bierze udział w rozplataniu dupleksów siRNA/miRNA (obecnie aktywność rozwijania dupleksów siRNA, a także miRNA, przypisuje się białkom z rodziny Ago (Kwak and Tomari 2012)). W roku 2006 J. Doudna i wsp. przedstawili strukturę krystaliczną Dicer pochodzącej z ludzkiego pasożyta *Giardia intestinalis* (Macrae et al. 2006). *Giardia* Dicer (GiDicer) posiada jedynie domenę platformy, PAZ i dwie domeny RNazowe (IIIa i IIIb), dlatego nazywana jest często „minimalną Dicer” (białko o masie ok. 80 kDa, zawierające ok. 750 reszt aminokwasowych). Jak dotąd, nie udało się poznać kompletnej struktury krystalicznej żadnej innej Dicer czy białek DCL, poza GiDicer. Wynika to najprawdopodobniej z wielkości oraz poziomu złożoności białek typu Dicer i związanym z tym faktem problemem uzyskiwania dużej ilości homogennych preparatów białkowych. Znane są jedynie struktury krystaliczne wybranych domen Dicer oraz struktury fragmentów

Dicer o stosunkowo niskiej rozdzielczości, otrzymane za pomocą mikroskopii krio-elektronowej (cryo-EM). Niemniej jednak, poznanie struktury GiDicer pozwoliło na zaproponowanie mechanizmu działania wszystkich rybonukleaz typu Dicer. Dane strukturalne ujawniły, że odległość pomiędzy miejscem aktywnym RNazy III a szczeliną domeny PAZ, w której wiązane są niesparowane nukleotydy obecne na końcu 3' RNA (kieszeń 3'), odpowiada długości 25 par zasad (pz) w dsRNA. Stwierdzono zatem, że długość fragmentów RNA produkowanych przez Dicer zależy od odległości jaka dzieli domeny RNazy III i PAZ, a odległość ta, jak się uważało, warunkowana jest długością helisy łączącej obie domeny (Macrae et al. 2006). W miarę rozwoju badań nad Dicer i pojawianiem się nowych doniesień literaturowych dotyczących budowy i funkcjonowania tego enzymu, model zaproponowany przez W. Filipowicza i wsp. (Zhang et al. 2004) oraz Doudna i wsp. (Macrae et al. 2006) był aktualizowany. Obecnie wiadomo, że Dicer, oprócz kieszeni 3', posiada także kieszeń wiążącą koniec 5' substratów RNA (kieszeń 5') (Park et al. 2011; Tian et al. 2014). Kieszeń ta zlokalizowana jest w obrębie domen platformy oraz PAZ i jak się uważa jest charakterystyczna dla białek z grupy Dicer-1/DCL-1 wiążących pre-miRNA. Substraty pre-miRNA, w porównaniu do dsRNA, posiadają zazwyczaj częściowo sparowane końce 5' i 3', które można łatwiej rozpleść (Park et al. 2011; Tian et al. 2014). Dodatkowo, wyniki szczegółowych badań dotyczących domeny helikazowej Dicer ujawniły, że domena ta bierze udział w rozpoznawaniu i różnicowaniu substratów pre-miRNA/dsRNA poprzez oddziaływanie z jednoniciowymi rejonami pętli pre-miRNA (Tsutsumi et al. 2011; Gu et al. 2012; Ma et al. 2012; Taylor et al. 2013). Rola domeny DUF283 pozostawała niejasna.

Wnikliwa analiza danych literaturowych dotyczących rybonukleaz typu Dicer zaowocowała powstaniem pracy przeglądowej „*The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities*” (artykuł koncentruje się głównie na hDicer). W genomie człowieka, podobnie jak w genomach innych kręgowców, zakodowana jest tylko jedna rybonukleaza Dicer (gen *DICER1*). W pracy przeglądowej zawarty został opis genu *DICER1*, zidentyfikowanych transkryptów oraz szczegółowa charakterystyka enzymu. Ponadto, opisana została problematyka regulacji ekspresji genu *DICER1* na wszystkich możliwych poziomach, począwszy od kontroli epigenetycznej, a skończywszy na regulacji aktywności Dicer na poziomie białka i jego substratów (Ryc. 1). Obecnie wiadomo, że poziom akumulacji rybonukleazy Dicer jest ściśle regulowany i specyficzny dla określonego typu komórek czy tkanek, podczas ich każdego

stadium rozwojowego. Jakiegokolwiek zaburzenia i odchylenia od prawidłowego, fizjologicznego poziomu Dicer w komórce mogą prowadzić do powstawania różnego rodzaju procesów patologicznych, w tym nowotworowych. Biorąc pod uwagę ten istotny problem, w publikacji przeglądowej zamieszczony został również rozdział dotyczący powiązania procesów nowotworowych ze zmienionym, odbiegającym od stanu fizjologicznego, poziomem ekspresji *DICER1* oraz z mutacjami w tym genie.



Rycina 1. Regulacja biosyntezy i aktywności Dicer w komórkach ludzkich

Na podstawie: *“The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities”*, Kurzynska-Kokorniak et al. (2015). Skróty: Ago2 – ang. Argonaute protein 2, HIV – ang. human immunodeficiency virus, KSRP – ang. KH-type splicing regulatory protein, PACT – ang. protein activator of interferon-induced protein kinase, PKC – ang. protein kinase C, PTM – modyfikacje potranslacyjne, TRBP – ang. HIV-1 trans-activation response element RNA-binding protein; [?] – Coraz częściej pojawiają się doniesienia literaturowe opisujące nowe funkcje Dicer. Co ciekawe, „dodatkowe” funkcje Dicer wydają się być powiązane z występowaniem skróconych form tego białka. Zauważono, iż podczas apoptozy rybonukleaza Dicer staje się substratem dla uwalnianych kaspaz. DNaza Dicer, otrzymywana z RNazy Dicer w wyniku aktywności proteolitycznej kaspaz, zaznaczona została kolorem szarym. Aktywność DNazy Dicer została zaobserwowana tylko u nicienia *C. elegans*, nie została ona potwierdzona dla hDicer.

II. Cele badawcze

W momencie rozpoczynania mojej przygody z hDicer, wiedza na temat czynników regulujących aktywność tejże rybonukleazy była niewielka. Większość ówczesnych badań skupiała się na ustaleniu poziomu ekspresji genu kodującego hDicer w różnych typach komórek. Wiadomo było, że na aktywność hDicer wpływ mają jej partnerzy białkowi, np. białko TRBP (ang. *HIV-1 trans-activation response element RNA-binding protein*) czy PACT (ang. *protein activator of interferon-induced protein kinase*) (Chendrimada et al. 2005; Haase et al. 2005; Lee et al. 2006). Szczególnie mało wiadomo było na temat czynników niebiałkowych, które potencjalnie mogą regulować aktywność tego enzymu, np. kwasów nukleinowych. Nieznana była również rola domeny DUF283 białek typu Dicer w procesie biogenezy srRNA; stąd też pochodzi nazwa domeny - DUF – ang. *domain of unknown function*. Ponadto, większość doniesień literaturowych koncentrowała się na rybonukleazach zwierzęcych, natomiast roślinne białka typu Dicer ciągle pozostawały stosunkowo słabo poznane.

Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej fakty, moja uwaga skupiła się na zgłębieniu trzech problemów badawczych, kolejno:

- (i) Czy aktywność rybonukleazy hDicer może być regulowana nie tylko przez białka, ale także przez cząsteczki kwasów nukleinowych, w szczególności przez krótkie jednoniciowe RNA (ang. *single-stranded RNA*, ssRNA)?**
- (ii) Czy domena DUF283 rybonukleazy hDicer może uczestniczyć w procesie rozpoznawania i wiązania kwasów nukleinowych?**
- (iii) Czy aktywność roślinnych białek typu Dicer jest regulowana przez te same czynniki, które regulują aktywność hDicer?**

II a. Identyfikacja cząsteczek RNA regulujących aktywność hDicer *in vitro*

Pierwszym celem prowadzonych badań była próba odpowiedzi na pytanie: **czy cząsteczki RNA mogą być nie tylko substratami, ale i regulatorami aktywności enzymatycznej ludzkiej rybonukleazy Dicer?**

Odpowiedź na to pytanie została zawarta w trzech pracach oryginalnych: (i) „*Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro*”, (ii) “*A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer*” oraz (iii) “*How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing*”.

Początkowo założyliśmy, że cząsteczki regulujące aktywność rybonukleazy hDicer mogą znajdować się w grupie RNA wiązanych przez tę rybonukleazę. Praca zatytułowana „*Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro*” opisuje proces selekcji cząsteczek RNA, które mogą być potencjalnymi regulatorami aktywności hDicer. Biblioteka kombinatoryczna, która była przedmiotem selekcji, zawierała zbiór 56-nt RNA, czyli cząsteczek o długości zbliżonej do pre-miRNA. Stosując standardową metodę selekcji RNA *in vitro* (SELEX) (Ellington and Szostak 1990), w obecności komercyjnie dostępnej hDicer, zidentyfikowaliśmy 120 różnych cząsteczek RNA wiążących się z tą rybonukleazą. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne pozwoliły na scharakteryzowanie i pogrupowanie wyselekcjonowanych cząsteczek pod kątem występowania wspólnych motywów sekwencyjnych (motywów pierwszorzędowych) oraz motywów strukturalnych (motywów drugorzędowych). Następnie zbadany został potencjał regulatorowy wybranych cząsteczek RNA (16 cząsteczek) reprezentujących różne, zdefiniowane za pomocą analiz biochemicznych, rodziny motywów pierwszo- i drugorzędowych. Aktywność regulatorowa wybranych cząsteczek testowana była w warunkach *in vitro*. W mieszaninach reakcyjnych znajdowały się: substrat (pre-miRNA), potencjalny regulator RNA (stymulator bądź inhibitor) oraz hDicer, w równych stężeniach molowych. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że z grupy 16 analizowanych cząsteczek RNA, tylko sześć hamowało cięcie wybranego pre-miRNA z wydajnością większą niż 10%. Żadna z testowanych cząsteczek nie stymulowała aktywności hDicer. Sześć najaktywniejszych cząsteczek RNA zostało poddanych szczegółowej analizie w celu

zbadań przypuszczalnego mechanizmu ich działania. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że aktywność hDicer może być regulowana przez cząsteczki RNA wiążące się z tym enzymem. W puli potencjalnych inhibitorów hDicer, wyłonionych w procesie selekcji RNA *in vitro*, znaleźliśmy RNA, które w podobny sposób hamowały proces dojrzewania wielu badanych miRNA (inhibitory uniwersalne). W grupie inhibitorów uniwersalnych znalazły się RNA, które były cięte przez hDicer; cząsteczki te zostały zaklasyfikowane jako inhibitory kompetycyjne. Pozostałą część inhibitorów uniwersalnych stanowiły RNA niecięte przez tę rybonukleazę, zaklasyfikowane jako potencjalne inhibitory allosteryczne. Co ciekawe, nasze badania pozwoliły również zidentyfikować cząsteczki RNA, które działały w sposób selektywny. Cząsteczki te hamowały powstawanie określonych miRNA i nie miały wpływu na proces cięcia przez hDicer innych badanych pre-miRNA. Na tym etapie badań nie zaobserwowaliśmy jednak, aby potencjał inhibitorowy testowanych cząsteczek zależał od ich struktury pierwszo- i/lub drugorzędowej.

Mechanizm działania selektywnych inhibitorów był przedmiotem dalszych badań i został opisany w kolejnej pracy ***“A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer”***. Zgromadzone dane ujawniły, że za proces selektywnej inhibicji powstawania określonych cząsteczek miRNA odpowiedzialne są oddziaływania pomiędzy prekursorami danych miRNA (pre-miRNA) oraz regulatorami RNA, warunkowane obecnością sekwencji komplementarnych w obu cząsteczkach. W grupie testowanych cząsteczek znalazł się uprzednio wyselekcjonowany 56-nt ssRNA niehydrolizowany przez hDicer, posiadający 20-nt sekwencję komplementarną do pre-miRNA będącego przedmiotem badań (pre-mir-210). W wyniku oddziaływań pre-miRNA z regulatorem dochodziło do zaburzenia struktury drugo- i trzeciorzędowej prekursora. W konsekwencji, prekursor nie był w sposób specyficzny rozpoznawany i wiązany przez hDicer i nie dochodziło do powstawania określonych miRNA. Badany regulator RNA wiązał się zarówno z hDicer (inhibitor hDicer), jak również z pre-miRNA (inhibitor procesu uwalniania miRNA z prekursora) – regulator dwufunkcyjny. Jednym z ciekawszych przypadków okazał się 56-nt regulator RNA, który był cięty przez hDicer, a produkty jego cięcia (po uwolnieniu przez enzym) dodatkowo hamowały proces hydrolizy pre-mir-210 przez hDicer. Szczegółowa analiza ujawniła, że krótszy z produktów cięcia (21-nt) wiąże się z rejonem apikalnym testowanego pre-miRNA dzięki obecności 12-nt sekwencji komplementarnej (kolejny przykład inhibitora dwufunkcyjnego). Zatem wyselekcjonowany

inhibitor dwufunkcyjny działał dwuetapowo, w pierwszym etapie jako inhibitor uniwersalny hDicer, w drugim etapie, jako inhibitor specyficzny procesu cięcia pre-mir-210 przez hDicer. Uzyskane wyniki jasno wskazywały, że za proces selektywnej inhibicji powstawania określonych cząsteczek miRNA odpowiedzialne są oddziaływania pomiędzy prekursorami danych miRNA oraz komplementarnymi regulatorami RNA. Ponadto, zgromadzone dane pozwalały sądzić, że selektywność inhibicji zapewniona jest przez zaledwie 12-nt sekwencje komplementarne obecne w badanych regulatorach. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, zaprojektowaliśmy 12-nt oligomery RNA komplementarne do rejonów apikalnych wybranych pre-miRNA. Zaprojektowane oligomery RNA, a także ich pochodne (2'-O-metylo-RNA), testowane były w warunkach *in vitro*, zarówno z użyciem rekombinowanej hDicer jak i w ekstraktach cytoplazmatycznych pochodzących z komórek ludzkich. Przeprowadzono także szereg reakcji kontrolnych, w których obecne były pre-miRNA i poszczególne 12-mery, nieposiadające sekwencji komplementarnych wobec testowanych prekursorów (reakcje krzyżowe). Uzyskane wyniki wykazały, że testowane 12-mery RNA wydajnie i selektywne hamują proces powstawania określonych cząsteczek miRNA w warunkach *in vitro*. Ponadto zaobserwowaliśmy, że 12-nt RNA nie oddziałują z hDicer w zastosowanych warunkach reakcyjnych, czemu przypisujemy selektywność inhibicji uwalniania określonych miRNA z ich prekursorów.

Badania, zaprezentowane w dwóch powyżej omówionych publikacjach, przeprowadzone zostały z wykorzystaniem komercyjnej hDicer. Komercyjnie dostępne preparaty były odpowiednie do prowadzenia wstępnych badań procesu cięcia pre-miRNA przez hDicer oraz jego inhibicji. Niemniej jednak szczegółowe badania, w szczególności dotyczące wiązania RNA i hDicer, wymagały użycia preparatów białkowych o dużym stopniu homogenności i znanym składzie. Z tego względu opracowaliśmy własny system otrzymywania rekombinowanej hDicer. Produkcja preparatu zawierającego hDicer, charakterystyka jego aktywności, kontynuacja oraz podsumowanie dotychczasowych badań *in vitro* dotyczących regulacji aktywności hDicer za pomocą krótkich RNA zostały opisane w kolejnej pracy oryginalnej zatytułowanej ***“How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing”***.

Pierwsze preparaty zawierające aktywną rekombinowaną hDicer zostały otrzymane niezależnie przez grupę O. Radmark'a i wsp. (Provost et al. 2002) oraz W. Filipowicza i wsp.

(Zhang et al. 2002). Oba zespoły do produkcji rekombinowanej hDicer wykorzystwały komórki owadzie i bakulowirusowy system ekspresji genów. Od tego czasu rekombinowana hDicer uzyskiwana jest z powodzeniem w wielu laboratoriach badawczych (Ma et al. 2008; Lima et al. 2009). Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe, opracowaliśmy własną procedurę otrzymywania rekombinowanej hDicer w systemie bakulowirusowym. Sekwencja kodująca hDicer, wykorzystana do otrzymania konstruktu, pochodziła z zakupionego wektora pBluescriptR_Dicer (zawiera cDNA pozwalający uzyskać kompletną hDicer - PubMed, NM_030621). Dodatkowo, otrzymywana hDicer została zaopatrzona w znacznik heksahistydynowy na końcu N. Białko oczyszczane było dwuetapowo, metodą chromatografii powinowactwa oraz chromatografii jonowymiennej. Uzyskiwany preparat wykazuje aktywności: i) rybonukleazową oraz ii) wiązania kwasów nukleinowych, przy czym aktywność rybonukleazowa naszego preparatu jest porównywalna do aktywności rybonukleazowej preparatów komercyjnych. Nasz preparat jest jednak zdecydowanie bardziej homogeny (> 95%) niż preparaty hDicer dostępne komercyjnie, dzięki czemu może być wykorzystywany do szczegółowych badań wiązania RNA z hDicer, zmierzających do poznania mechanizmów regulacji aktywności hDicer za pomocą krótkich RNA. Produkcja hDicer w komórkach owadzie odbywała się we współpracy z prof. Krystyną Bieńkowską-Szewczyk z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, Gdańsk. Prof. Bieńkowska-Szewczyk posiada zaplecze i duże doświadczenie niezbędne do produkcji białek w komórkach owadzie za pomocą bakulowirusowego systemu ekspresji genów Bac-to-Bac (partner naukowy w projekcie POMOST – grant autorki).

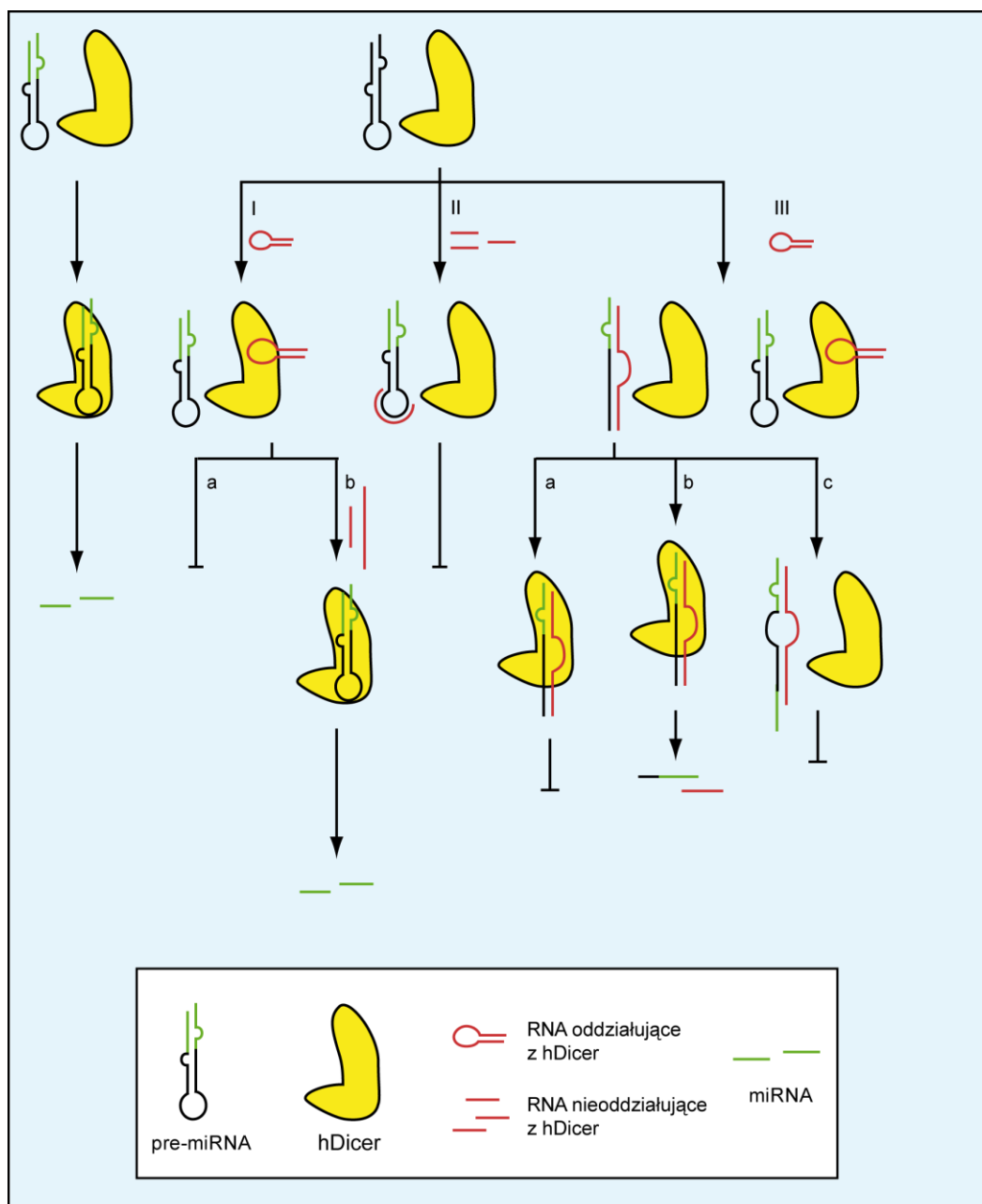
Badania, zaprezentowane w dwóch pierwszych pracach, zostały powtórzone z wykorzystaniem otrzymanego preparatu hDicer. Uzyskane wyniki potwierdziły, że reakcje cięcia pre-miRNA przez hDicer oraz inhibicja tego procesu w obecności regulatorowych RNA, zachodziły z podobną wydajnością zarówno w przypadku komercyjnej hDicer, jak i naszego preparatu białkowego. Ponadto, w pracy ***“How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity (...)”*** pokazaliśmy, że hDicer może wydajnie wiązać ssRNA o długości > 20-nt. Biorąc pod uwagę rezultaty naszych dotychczasowych badań oraz fakt, że cząsteczki miRNA uwalniane z ramienia 5' pre-miRNA są komplementarne do ramienia 3' pre-miRNA i na odwrót, zadaliśmy sobie kolejne pytanie: czy miRNA mogą uczestniczyć w procesie autoregulacji cięcia prekursorów, z których pochodzą? Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że w istocie, niektóre z krótkich RNA, imitujących miRNA,

podane w nadmiarze do mieszanin reakcyjnych, mogą wydajnie hamować proces cięcia pre-miRNA, z których się wywodzą. Co ciekawe, dalsze badania oraz analizy bioinformatyczne wykazały, że istnieje grupa miRNA posiadających sekwencje częściowo, a nawet w pełni komplementarne do niepowiązanych z nimi pre-miRNA. Przykładem pierwszej pary są cząsteczki: miR-33a i pre-mir-21, natomiast przykładem drugiej pary są: miR-318 i pre-mir-42 oraz miR-352 i pre-let7-miRNA; program umożliwiający znajdowanie sekwencji komplementarnych w obrębie, bądź pomiędzy zbiorami sekwencji został opisany w publikacji oryginalnej, która obecnie jest w recenzji (***EvOligo – a novel software to design and group libraries of oligonucleotides applicable for nucleic acid-based experiments***, w recenzji w *Journal of Computational Biology*). Co ciekawe i istotne w kontekście przedłożonego problemu, w ostatnich latach ukazały się publikacje pokazujące, że komórkowe miRNA mogą być zaangażowane w regulację procesu ich biogenezy, poprzez oddziaływanie z sekwencjami komplementarnymi, które występują w obrębie pierwotnych transkryptów miRNA (pri-miRNA). Co więcej, sekwencje komplementarne do miRNA, występujące w pri-miRNA poza fragmentem obejmującym uwalniany pre-miRNA, zostały zidentyfikowane zarówno dla układu *in cis* (przykład let7-miRNA i pri-let7-miRNA (Zisoulis et al. 2012)), jak i *in trans* (przykład pary: miR-709 i pri-mir-15a/16-1 (Tang et al. 2011)). Ponadto, dane opublikowane w roku 2014 jasno wskazują, że pri-miRNA mogą także oddziaływać z długimi niekodującymi RNA (Liz et al. 2014). Pokazano, że ~250-nt niekodujący RNA, posiadający zaledwie 11-nt sekwencję komplementarną do ramienia 3' pri-mir-195, może hamować biogenezę miR-195 poprzez wiązanie się do tego prekursora (Liz et al. 2014). Rozpatrując badany problem należy podkreślić, że wcześniej Michlewski i wsp. zaobserwowali, że aptamery (oligonukleotydy) oddziałujące z pętlą apikalną niektórych pri-miRNA mogą blokować wiązanie białek istotnych w procesie cięcia tychże pri-miRNA przez rybonukleazę Drosha (RNaza III inicjująca biogenezę miRNA), tym samym hamując proces dojrzewania powstających z nich pre-miRNA, a w konsekwencji miRNA (Michlewski et al. 2008; Michlewski and Caceres 2010). Wspomniane publikacje (Michlewski et al. 2008; Michlewski and Caceres 2010; Tang et al. 2011; Zisoulis et al. 2012; Liz et al. 2014) dotyczą problemu regulacji biogenezy miRNA na etapie uwalniania pre-miRNA z pri-miRNA, przy udziale rybonukleazy Drosha - etapu zachodzącego w jądrze komórkowym. Niemniej jednak, wyniki naszych dotychczasowych badań jasno wskazują, że regulacja procesu biogenezy miRNA za pomocą cząsteczek RNA jest również możliwa na etapie cytoplazmatycznym. Opisanym w literaturze przykładem regulacji aktywności Dicer

za pomocą cząsteczek RNA jest sekwestracja Dicer przez wirusowe transkrypty (Lu and Cullen 2004; Andersson et al. 2005). Dicer związana z wirusowymi RNA, przyjmującymi struktury typu spinki do włosów, nie może produkować specyficznych miRNA hamujących replikację wirusa.

Dodatkowo, przeprowadziliśmy analizę bioinformatyczną transkryptomu człowieka pod kątem występowania krótkich sekwencji identycznych bądź znacząco podobnych do sekwencji testowanych przez nas oligomerów RNA wpływających na aktywność hDicer. Okazało się, że wśród otrzymanych sekwencji znajdowały się motywy pierwszorzędowe występujące w cząsteczkach RNA, które wydajnie i specyficznie hamowały proces dojrzewania wybranych miRNA (sekwencje komplementarne do pre-miRNA). Badania *in vitro* przedstawione w publikacji ***“How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity (...)”*** pokazały, że zidentyfikowane i otrzymane fragmenty transkryptów, zawierające ok. 30-nt sekwencje komplementarne do wybranych pre-miRNA, z dużą wydajnością i specyficznością hamowały proces powstawania odpowiednich miRNA. W cytoplazmie znajduje się wiele różnych RNA, w tym frakcja krótkich RNA, którą reprezentują np. stabilne produkty przejściowe degradacji RNA (Jackowiak et al. 2011). Możemy sobie zatem wyobrazić, iż krótkie cząsteczki RNA regulujące w sposób specyficzny proces biogenezy określonych miRNA, tj. krótkie RNA komplementarne wobec określonych pre-miRNA, mogą występować w cytoplazmie komórek. W najbliższym czasie chciałabym skupić się na poszukiwaniu endogennych RNA mogących wpływać na aktywność hDicer oraz na próbie odpowiedzi na pytania: czy cząsteczki te są komórkowo/tkankowo-specyficzne i czy mogą działać w sposób selektywny, tzn. czy mogą wpływać na proces biogenezy określonych miRNA?

Podsumowując, zgromadzone wyniki, opisane w trzech wspomnianych publikacjach oryginalnych, pozwoliły na zaproponowanie modelu regulacji aktywności rybonukleazowej hDicer oraz procesu uwalniania miRNA z ich prekursorów za pomocą krótkich RNA (Ryc. 2).



Rycina 2. Możliwe scenariusze regulacji aktywności hDicer oraz procesu uwalniania miRNA z ich prekursorów za pomocą krótkich RNA

Na podstawie: *“How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing”*, Koralewska et al. (2016). Schematyczna reprezentacja: procesu hydrolizy pre-miRNA przez hDicer (po lewej); inhibitorów hDicer (I), allosterycznych (Ia) i kompetycyjnych (Ib); inhibitorów procesu uwalniania miRNA z ich prekursorów, tj. krótkich RNA komplementarnych wobec określonych pre-miRNA (II); inhibitorów dwufunkcyjnych, wiążących zarówno hDicer, jak i pre-miRNA (III). Kompleks złożony z inhibitora RNA i pre-miRNA: nie jest hydrolizowany po związaniu przez hDicer (IIIa), jest hydrolizowany przez hDicer, jednak wzór cięcia pre-miRNA jest odmienny w porównaniu do reakcji zachodzącej bez regulatora RNA - nie powstają funkcjonalne miRNA (IIIb), nie jest rozpoznawany i wiązany przez hDicer (IIIc).

Komentarz

Cząsteczki uzyskiwane w procesie selekcji *in vitro* nazywane są aptamerami; określenie to pochodzi od łacińskiego słowa *aptus*, co oznacza *pasować*. Aptamery wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania cząsteczek, wobec których były selekcjonowane (nano- lub pikomolowa stała wiązania/dysocjacji tworzonych kompleksów). Niemniej jednak najniższa stała wiązania, wyznaczona dla jednej z cząsteczek RNA nieciętych przez hDicer, wynosiła 600 nM. Stałe wiązania wyznaczone dla pozostałych cząsteczek RNA były zdecydowanie wyższe ($> 1 \mu\text{M}$). Ze względu na tak wysokie wartości stałych wiązania, dodatkowo uwzględniając sugestie recenzentów pracy „*Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro*”, wyselekcjonowane RNA nazwane zostały oligomerami RNA wiążącymi hDicer. W tym momencie warto wspomnieć, że wyznaczone wartości stałych wiązania mieściły się w przedziale wartości stałych wiązania/dysocjacji wyznaczonych przez Lima i wsp. dla kompleksu hDicer i różnych ssRNA o długości ~20-nt, tj. od ~130 nM do ~2,3 μM (Lima et al. 2009). Dodatkowo, doniesienia literaturowe dotyczące wiązania przez hDicer cząsteczek pre-miRNA oraz dupleksów RNA o długości ok. 35 par zasad (pz) wskazują, że stała wiązania kompleksu hDicer i pre-miRNA zawiera się w przedziale od ~2 nM do ~30 nM, natomiast hDicer i ~35-pz dsRNA, od ~3,5 nM do ~75 nM, w zależności od źródła (Ma et al. 2008; Chakravarthy et al. 2010). W tym miejscu należy podkreślić, że wszystkie wspomniane wartości dotyczą kompleksów zawierających jedynie hDicer i RNA. Jak obecnie wiadomo, w komórkach Dicer oddziałuje z licznymi białkami, np. TRBP czy PACT, które mają znaczący wpływ na powinowactwo Dicer do substratów (Chendrimada et al. 2005; Haase et al. 2005; Lee et al. 2006; Chakravarthy et al. 2010). Problem wiązania RNA przez Dicer staje się jeszcze bardziej skomplikowany jeśli weźmiemy pod uwagę czynniki komórkowe oddziałujące w sposób selektywny z określonymi substratami Dicer, np. białko Lin28, które wiąże się z prekursorami z rodziny let-7 pre-miRNA (Viswanathan et al. 2008; Viswanathan and Daley 2010; Heo et al. 2012) i blokuje proces ich cięcia przez Dicer. Szczegółowy opis czynników selektywnie oddziałujących z określonymi pre-miRNA i ich stymulujących bądź hamujący wpływ na proces biogenezy miRNA można znaleźć w pracy przeglądowej „*The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities*”.

Perspektywy

Badanie potencjału inhibitorowego oligomerów RNA w komórkach

Wpływ najaktywniejszych inhibitorów na wydajność cięcia substratów pre-miRNA przez hDicer, a tym samym na wydajność powstawania funkcjonalnych miRNA testowaliśmy również w komórkach ludzkich: HeLa (linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy) oraz HEK293 (linia ludzkich embrionalnych komórek nerkowych). Komórki transfekowane były modyfikowanymi inhibitorami (2'-O-metylo-RNA) oraz odpowiednim, specyficznym wobec badanego miRNA, konstruktem reporterowym zawierającym gen lucyferazy. Zgodnie z założeniami, translacja lucyferazy powinna być hamowana poprzez wiązanie miRNA do komplementarnych sekwencji obecnych w rejonie regulatorowym 3' nieulegającym translacji (3'-UTR) transkryptu lucyferazy. Ocena potencjału inhibitorowego wybranych cząsteczek badana była za pomocą pomiaru aktywności lucyferazy, w różnych punktach czasowych. Z uwagi na fakt, że podawane inhibitory nie wpływają bezpośrednio na pulę miRNA obecnych w komórkach, tylko na proces powstawania nowych cząsteczek regulatorowych, zaplanowane badania wymagały prowadzenia wielu reakcji kontrolnych. W większości przypadków podanie inhibitorów specyficznych wobec określonych pre-miRNA wpływało na poziom wybranych miRNA w komórce, a efekt ten był różny, w zależności od czasu zakończenia hodowli (dane nieopublikowane). Testowanie inhibitorów biogenezy miRNA w komórkach wymaga jednak dalszych badań. Prace te są kontynuowane w ramach ostatnio nawiązanej współpracy z Dr Marie-Laure Baudet (University of Trento, Włochy). Dr Baudet bada udział cząsteczek miRNA w procesie tworzenia połączeń nerwowych. Przedmiotem współpracy jest projektowanie i otrzymywanie uniwersalnych inhibitorów żabiej rybonukleazy Dicer oraz specyficznych inhibitorów biogenezy cząsteczek miRNA zaangażowanych w proces powstawania połączeń nerwowych w tkance mózgowej, podczas rozwoju embrionalnego żaby szponiastej (*Xenopus laevis*).

Wpływ G-kwadrupleksów na aktywność hDicer

W trakcie prowadzonych badań zaobserwowaliśmy, że jeden z zaprojektowanych 12-nt inhibitorów procesu cięcia pre-miRNA przez hDicer (12-mer komplementarny do pętli apikalnej pre-mir-210) hamował działanie hDicer w sposób uniwersalny, tj. bez względu na

rodzaj substratu podanego do reakcji. Wstępna analiza mechanizmu inhibicji tej reakcji wykazała, że badana cząsteczka inhibitorowa oddziałuje bezpośrednio z enzymem. Biorąc pod uwagę fakt, że pozostałe testowane 12-mery RNA nie oddziaływały z hDicer, postanowiliśmy wnikliwiej przestudiować opisany przypadek. Testowany inhibitor różnił się od pozostałych 12-merów charakterystyczną sekwencją, tj. zawierał ciąg guanozyn (G). Szczegółowe badania wykazały, iż cząsteczka ta przyjmuje strukturę G-kwadrupleksu i najprawdopodobniej w takiej formie oddziałuje z hDicer. Następnie przeprowadziliśmy szereg reakcji cięcia wybranych pre-miRNA przez hDicer, dodając do nich opisane w literaturze cząsteczki RNA oraz DNA przyjmujące struktury kwadrupleksów (Liu et al. 2002; Martadinata and Phan 2009; Martadinata and Phan 2013; Martadinata and Phan 2014). Wszystkie z testowanych cząsteczek, w mniejszym bądź większym stopniu, hamowały proces powstawania badanych miRNA. Co ciekawe, hDicer wiązała się z wszystkimi ww. cząsteczkami (dane nieopublikowane). Badania dotyczące wpływu struktur kwadrupleksowych na aktywność Dicer prowadzone były także w innych ośrodkach badawczych, np. Department of Chemistry and Biochemistry, Kent State University, Kent, USA. W pracy opublikowanej na początku roku 2015, zatytułowanej „*A Potassium Ion-Dependent RNA Structural Switch Regulates Human Pre-miRNA 92b Maturation*” (Mirihana Arachchilage et al. 2015), nie zaproponowano jednak mechanizmu, który prowadzi do zahamowania aktywności rybonukleazowej Dicer. Wyniki przedstawione we wspomnianej publikacji ujawniają jedynie, że dojrzewanie niektórych miRNA może być regulowane poprzez zmiany zachodzące w strukturze drugo- i trzeciorzędowej ich cząsteczek prekursorowych (pre-miRNA). Zmiany te indukowane są obecnością jonów potasu; w takich warunkach pre-miRNA zawierające ciągi guanozyn mogą przyjmować struktury zawierające G-kwadrupleksy. Biorąc pod uwagę istotną i udokumentowaną rolę struktur kwadrupleksowych w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, planuję kontynuację niniejszych badań w układach komórkowych.

II b. Charakterystyka ludzkiej domeny DUF283 pod kątem oddziaływań z kwasami nukleinowymi

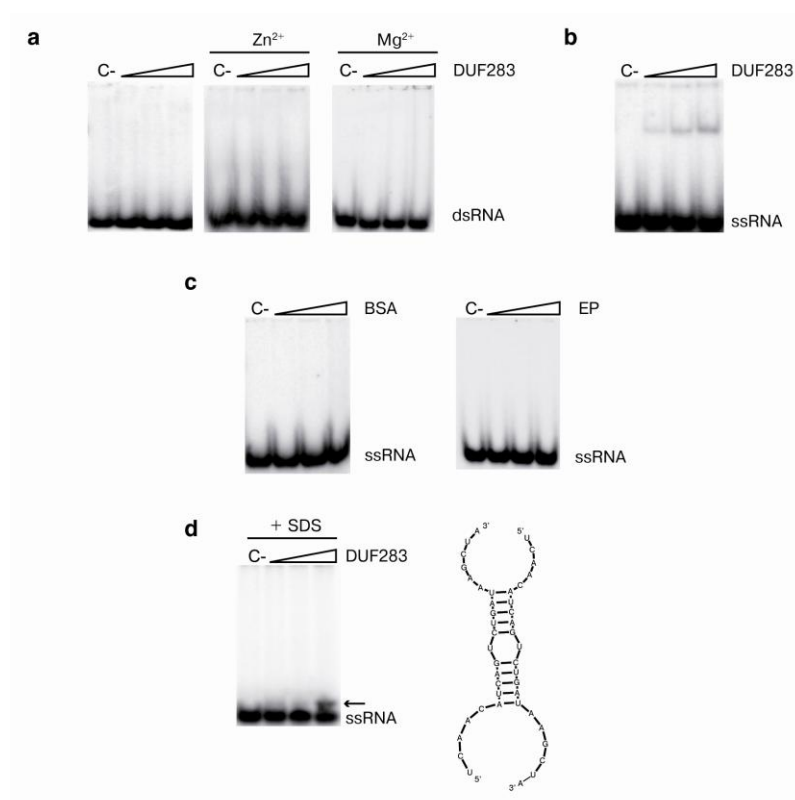
Rezultaty zaprezentowanych powyżej badań nasunęły kolejne pytanie: **które z domen hDicer mogą oddziaływać z ssRNA?**

Dotychczasowe dane literaturowe wskazywały, że Dicer może wiązać nie tylko dsRNA, ale także może ona oddziaływać z ssRNA (Lima et al. 2009). Częsteczki ssRNA mogłyby być wiązane przez domenę PAZ (Song et al. 2003) lub helikazę (Tsutsumi et al. 2011; Gu et al. 2012; Ma et al. 2012; Taylor et al. 2013), jednakże pokazano, że każda z tych domen oddziałuje także z dsRNA. Generalnie, w przypadku wszystkich domen Dicer, poza DUF283, pokazano, że uczestniczą one w procesie rozpoznawania, wiązania czy też cięcia RNA. W przypadku domeny DUF283, jedyną zaproponowaną do tej pory funkcją był udział tej domeny w oddziaływaniu z określonymi partnerami białkowymi Dicer. Co ciekawe, modelowania komputerowe ludzkiej DUF283 (Dlakic 2006) oraz badania strukturalne DUF283 pochodzącej z *Arabidopsis thaliana* DCL-4 (AtDCL-4) (Qin et al. 2010) wykazały, że domena ta posiada motyw α - β - β - α , który jest charakterystyczny dla białek wiążących dsRNA. Badania biochemiczne przeprowadzone przez Qin i wsp. nie potwierdziły jednak, aby DUF283 z AtDCL-4 mogła oddziaływać z dsRNA (Qin et al. 2010). Badacze pokazali natomiast, że roślinne DUF283 mogą wiązać partnerów białkowych rybonukleaz DCL. Dokładniej, autorzy wykazali, że DUF283 z AtDCL-1 oddziałuje specyficznie z domeną wiążącą dsRNA białka HYL1 (ang. *hyponastic leaves 1*), natomiast DUF283 z AtDCL-4, oddziałuje w sposób selektywny z innym białkiem wiążącym dsRNA, DRB4 (Qin et al. 2010). Kilka lat później pokazano, że DUF283 oraz domena helikazowa hDicer biorą udział w wiązaniu deaminazy adenozyiny dsRNA (ang. adenosine deaminase acting on RNA 1, ADAR1) (Ota et al. 2013). Ze względu na udział DUF283 w wiązaniu innych białek, domena ta często nazywana jest domeną dimeryzacji.

Biorąc pod uwagę fakt, że rola ludzkiej DUF283 w oddziaływaniu z kwasami nukleinowymi pozostawała niewyjaśniona, postanowiliśmy zbadać potencjalny udział tej domeny w wiązaniu różnych RNA, w tym testowanych przez nas oligomerów RNA. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w publikacji oryginalnej zatytułowanej **“Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro”**. Rekombinowana ludzka DUF283 została otrzymana w systemie bakteryjnym. Sekwencja kodująca DUF283 wykorzystana do otrzymania konstruktów, podobnie jak w przypadku hDicer, pochodziła z zakupionego wektora pBluescriptR_Dicer (PubMed, NM_030621). DUF283 została również zaopatrzona w znacznik histydynowy na końcu N (masa otrzymywanego białka rekombinowanego ~17 kDa). Białko oczyszczane było dwuetapowo, metodą chromatografii powinowactwa oraz chromatografii jonowymiennej, a otrzymany preparat był wysoce

homogenny (>95%). Początkowo pokazaliśmy, że ludzka DUF283, podobnie jak roślinna DUF283 z AtDCL-4, nie oddziałuje z dsRNA. Postanowiliśmy jednak sprawdzić czy ludzka DUF283 może wiązać inne formy kwasów nukleinowych, np. ssRNA. Wstępnie zbadaliśmy, czy DUF283 może wiązać ssRNA o długości miRNA/siRNA, czyli ~22-nt ssRNA. Okazało się, że ludzka DUF283 oddziałuje z 22-nt ssRNA! W naszej kolekcji znajdował się zbiór oligomerów RNA (regulatorów hDicer) o długościach od 12- do 62-nt. Sprawdziliśmy zatem czy DUF283 może oddziaływać z 12-, 32-, 42-, 52-, 62-merami RNA. Wyniki prowadzonych badań wykazały, że ludzka DUF283 wiązała wszystkie testowane oligomery, przy czym w przypadku cząsteczek >22-nt nie obserwowaliśmy pojedynczych kompleksów DUF283 i ssRNA, tylko ich całe spektrum. Dodatkowo, część materiału pozostawała w kieszonkach, dlatego nie byliśmy w stanie wyznaczyć stałych wiązania dla DUF283 i RNA >22-nt. Co ciekawe, zaobserwowaliśmy, że DUF283 może wiązać 12-nt RNA, jednakże kompleksy DUF283 i 12-nt RNA tworzyły się bardzo niewydajnie. Przypomnę w tym miejscu, że nie zaobserwowaliśmy tworzenia kompleksów pomiędzy 12-nt RNA i hDicer, co tłumaczymy stosunkowo wysokimi wartościami stałych wiązania dla DUF283 i 12-nt RNA (>20 μM) i stosunkowo niskim stężeniem hDicer użytej w eksperymentach opisanych w poprzednim podrozdziale (<5 μM). Wyraźne i stabilne kompleksy tworzyły się jedynie w przypadku DUF283 i ~20-nt RNA. Stała wiązania wyznaczona dla takich kompleksów wynosiła ~9,5 μM . Wartość ta mieściła się w zakresie wartości stałej wiązania wyznaczonej dla innej domeny Dicer, dsRBD i ~20-pz dsRNA: ~6,5 μM (Wostenberg et al. 2012), >8 μM (Doyle et al. 2013). Dla porównania, wartość stałej wiązania dla kompleksu hDicer (kompletne białko) i ~20-nt RNA mieściła się w przedziale od ~0,13- do ~2,3 μM (Lima et al. 2009).

Podczas przeprowadzania jednej z reakcji kontrolnych, w przypadku której produkty reakcji wiązania DUF283 i ssRNA rozdzielane były w buforze zawierającym czynnik denaturujący białko ale nie RNA (siarczan dodecyłu sodu), zaobserwowaliśmy, że oprócz produktów, które odpowiadają niezwiązanym ssRNA, powstawały także dodatkowe, wolniej migrujące produkty (Ryc. 3, prążek zaznaczony strzałką). Wnikliwa analiza pozwoliła ustalić, że testowany ssRNA posiada sekwencje samo-komplementarne, a obserwowane prążki odpowiadały homo-dimerowi tej cząsteczki. Takie homo-dimery nie powstawały w reakcjach kontrolnych, do których nie dodaliśmy DUF283 (Ryc. 3).



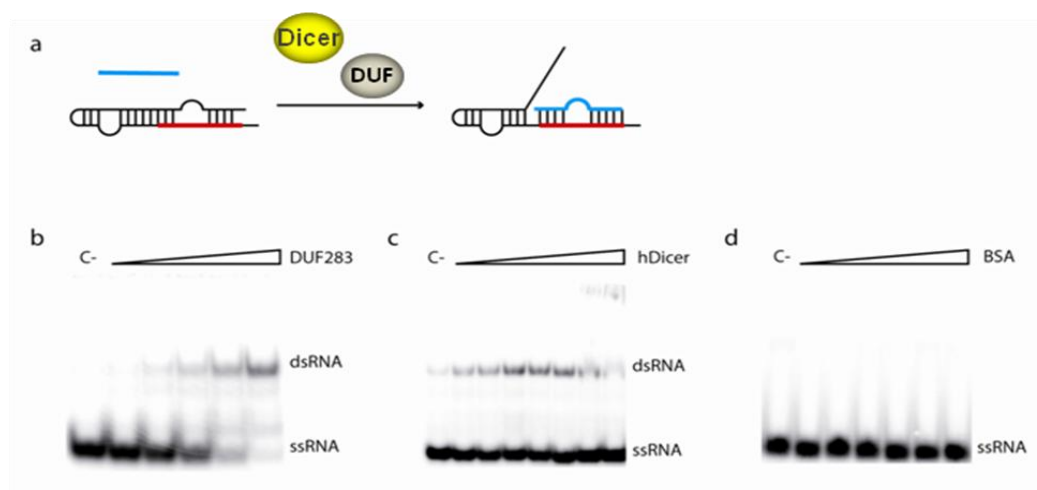
Rycina 3. DUF283 oddziałuje z jednoniciowymi RNA

Na podstawie: *“Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro”*, Kurzynska-Kokorniak *et al.* (2016). Wizualizacje natywnych żeli poliakrylamidowych, w których rozdzielane były produkty reakcji wiązania: (a) 22-pz dsRNA i DUF283, (b) 22-nt RNA i DUF283, (c) 22-nt RNA i BSA (kontrola) (po lewej), 22-nt RNA i preparatu uzyskiwanego z bakterii transformowanych plazmidem ekspresyjnym wykorzystanym do produkcji DUF283, jednak niezawierającym cDNA DUF283 (kontrola) [EP, ang. *empty plasmid*] (po prawej), (d) 22-nt RNA i DUF283, po dodaniu buforu zawierającego czynnik denaturujący białko ale nie RNA (siarczan dodecylu sodu), o stężeniu końcowym 0,2% (po lewej). Przewidziana struktura drugorzędowa homo-dimeru tworzonego przez testowaną cząsteczkę (22-nt RNA) (po prawej). [C-] – kontrole niezawierające białka. Trójkąty przedstawiają rosnące stężenie DUF283, BSA lub EP.

Otrzymane wyniki sugerowały, że DUF283 może działać jak białko opiekuńcze (ang. *a chaperone protein*) i wspierać proces parowania sekwencji komplementarnych (tzw. ang. *annealing activity*). W celu potwierdzenia naszej hipotezy przeprowadziliśmy szereg reakcji, które zawierały DUF283 i odpowiednio: (i) parę 22-nt RNA, posiadających w pełni komplementarne sekwencje, (ii) parę 22-nt i 21-nt RNA, posiadających częściowo komplementarne sekwencje oraz (iii) parę 29-nt DNA, posiadających w pełni komplementarne sekwencje. W przypadku wszystkich badanych par, DUF283, w znaczącym stopniu, wspierała proces ich hybrydyzacji, przy czym wydajność hybrydyzacji była

proporcjonalna do czasu reakcji i stężenia DUF283. Jeśli DUF283 nie została dodana do mieszanin reakcyjnych, proces hybrydyzacji wspomnianych par był niewydajny. Zadaliśmy sobie pytanie, czy hDicer będzie także wspierała proces hybrydyzacji RNA lub DNA zawierających komplementarne sekwencje? Reakcje zawierające trzy ww. pary zostały powtórzone z użyciem naszego preparatu hDicer. Okazało się, że hDicer również wspiera proces parowania sekwencji komplementarnych!

Dotychczas testowane układy zawierały stosunkowo krótkie oligomery RNA oraz DNA. Zadaliśmy sobie zatem pytanie, czy DUF283 i hDicer będą wspierać parowanie dwóch komplementarnych cząsteczek, dłuższej i krótszej, jeśli sekwencja komplementarna obecna w dłuższej cząsteczce będzie niedostępna dla cząsteczki krótszej, zgodnie ze schematem zaprezentowanym na Ryc. 4. Reakcje kontrolne prowadzone bez DUF283/ hDicer, bądź zawierające białko niewiążące kwasów nukleinowych (BSA, ang. *bovine serum albumin*), wykazały, że sekwencje komplementarne, obecne w dłuższej i krótszej cząsteczce, nie odnajdują się spontanicznie w zastosowanych warunkach reakcyjnych. Podanie DUF283, bądź hDicer, znacząco wspierało hybrydyzację komplementarnych cząsteczek RNA (Ryc. 4). Co ciekawe, zaobserwowaliśmy, że DUF283, w porównaniu do hDicer, wydajniej wspiera hybrydyzację cząsteczek zawierających sekwencje komplementarne, co tłumaczymy obecnością innych domen wiążących kwasy nukleinowe w hDicer. Przypuszczalnie, w przypadku kiedy w mieszaninach reakcyjnych znajdował się nadmiar hDicer w stosunku do ssRNA, różne domeny hDicer współzawodniczyły o wiązanie dostępnych ssRNA i tworzących się dsRNA. Przypomnę, że stała wiązania dla DUF283 i ssRNA jest stosunkowo wysoka, w porównaniu do stałych wiązania wyznaczonych dla hDicer i odpowiednich ssRNA; dodatkowo, wartości te są znacząco wyższe od stałych wiązania wyznaczonych dla hDicer i dsRNA.



Rycina 4. DUF283 i hDicer wspierają parowanie pomiędzy krótkim RNA i sekwencją do niego komplementarną obecną w dłuższej cząsteczce RNA

Na podstawie: “*Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro*”, Kurzynska-Kokorniak *et al.* (2016). (a) Schemat przedstawiający przebieg eksperymentu. Kolorowe linie obrazują sekwencje komplementarne. (b–d) Wizualizacje natywnych żeli poliakryloamidowych, w których rozdzielane były produkty reakcji hybrydyzacji zawierających 21-nt RNA (cząsteczka znakowana radioizotopowo) i 58-nt RNA oraz rosnące stężenia białek: (b) DUF 283, (c) hDicer lub (d) BSA (kontrola). Produkty reakcji rozdzielane były w buforze zawierającym SDS o stężeniu końcowym: 0,2%.

Obecnie nie ma danych strukturalnych dla kompleksu DUF283 i RNA, zatem trudno przewidzieć, które z reszt aminokwasowych mogłyby uczestniczyć w opisanej przez nas aktywności hDicer. Biorąc pod uwagę dane dotyczące samej DUF283 (Dłakic 2006; Qin *et al.* 2010), możemy przypuszczać, że cały szereg pozytywnie naładowanych reszt aminokwasowych, obecnych na powierzchni struktur β motywu α - β - β - β - α , może oddziaływać z jednoniciowymi kwasami nukleinowymi. Niestety, na podstawie powyższych założeń trudno zaprojektować i otrzymać pożądane mutanty hDicer. Postanowiliśmy zatem zbadać czy homolog hDicer, pochodzący z pierwotniaka *Giardia intestinalis*, GiDicer („minimalna” Dicer), który nie zawiera domeny DUF283, może wspierać proces parowania komplementarnych RNA. Przeprowadzone badania pokazały, że GiDicer, w przeciwieństwie do hDicer, nie wspierała hybrydyzacji ssRNA zawierających sekwencje komplementarne. Chociaż wyniki naszych badań jednoznacznie wskazują, że ludzka DUF283 ułatwia parowanie cząsteczek RNA oraz DNA zawierających sekwencje komplementarne, nie możemy wykluczyć, że inne domeny obecne w hDicer, również uczestniczą w tym procesie (np. domena helikazowa). Na podstawie przeprowadzonych badań możemy jednak wnioskować, że aktywność hDicer polegająca na wspieraniu hybrydyzacji

komplementarnych kwasów nukleinowych (aktywność charakterystyczna dla białek opiekuńczych) rozwinęła się u wyższych eukariontów.

Perspektywy

Analiza przedstawionych powyżej wyników nasuwa proste pytanie: gdzie i w jakich okolicznościach opisana przez nas aktywność hDicer mogłaby być przydatna w komórce? Zgodnie ze stechiometrycznym modelem regulacji ekspresji genów za pomocą miRNA, w komórkach powstaje zdecydowanie więcej miRNA, niż cząsteczek białka Ago (Janas et al. 2012). W konsekwencji, nie wszystkie miRNA mogą zostać związane z kompleksem RISC. Możemy sobie zatem wyobrazić, że Dicer (poza kompleksem RISC) może wspierać parowanie niezwiązanych przez Ago cząsteczek miRNA i komplementarnych sekwencji regulatorowych, które występują w rejonach 3'-UTR transkryptów. Co ciekawe, analiza transkryptomu człowieka pozwoliła na zidentyfikowanie tzw. rejonów (sekwencji) „pasywnych” wiążących Dicer (ang. *“passive” Dicer binding sites*) (Rybak-Wolf et al. 2014). Sekwencje te zlokalizowane są zazwyczaj w rejonach 3'-UTR transkryptów i przyjmują struktury typu spinki do włosów. Grupa prof. N. Rajewskiego wykazała, że Dicer może rozpoznawać i wiązać takie sekwencje; co więcej, po związaniu sekwencji pasywnych nie dochodzi do przecinania transkryptu przez Dicer. Obecność Dicer w obrębie rejonów 3'-UTR transkryptów może wspierać naszą hipotezę, że Dicer, działając poza kompleksem RISC, bezpośrednio uczestniczy w procesie regulacji ekspresji genów. Dicer, wspierając hybrydyzację pomiędzy miRNA i sekwencją komplementarną obecną w rejonie regulatorowym transkryptu, mogłaby hamować proces translacji określonych mRNA. W niedalekiej przyszłości chciałabym rozwinąć badania dotyczące potencjalnego, bezpośredniego udziału Dicer w procesie potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów oraz potencjalnego funkcjonowania Dicer jako białka opiekuńczego.

II c. Identyfikacja genów kodujących białka typu Dicer w modelowej roślinie *Medicago truncatula* i charakterystyka poziomu ich ekspresji

O ile zwierzęce Dicer wydają się stosunkowo dobrze poznane, nasza wiedza na temat roślinnych białek typu Dicer jest ciągle niewielka. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być fakt, że zdecydowana większość zwierząt posiada jedną, ewentualnie dwie rybonukleazy Dicer, natomiast roślinnych białek typu Dicer zidentyfikowano znacznie

więcej. W Instytucie Chemii Bioorganicznej od lat prowadzone są badania dotyczące układów symbiotycznych między roślinami motylkowatymi (gospodarzami) i bakteriami glebowymi rodzaju *Rhizobium* (symbiontami). Modelową rośliną wśród motylkowatych jest *Medicago truncatula* - roślina z gatunku lucerny, należąca do rodziny bobowatych. W wyniku symbiozy rośliny z bakteriami *Rhizobium* sp. powstają brodawki korzeniowe – wyspecjalizowane organy, w których panują warunki umożliwiające wiązanie azotu cząsteczkowego przez ww. bakterie do formy przyswajalnej przez rośliny. Symbioza i wiążący się z nią rozwój brodawek poprzedzone są „dialogiem molekularnym” pomiędzy gospodarzem a symbiontem. Oba te procesy wymagają produkcji specyficznych fitohormonów. Ustalenie symbiozy oraz tworzenie brodawek korzeniowych powiązane są także z aktywacją genów symbiotycznych u obu partnerów. Zidentyfikowano ponadto roślinne miRNA, które uczestniczą w procesie tworzenia brodawek korzeniowych (Oldroyd et al. 2011; Bazin et al. 2012). Ciągle niewiele jednak wiadomo na temat udziału białek typu Dicer we wspomnianym procesie. W *M. truncatula* zidentyfikowano zaledwie trzy geny kodujące białka typu Dicer, odpowiednio *MtDCL-1*, *-2* oraz *-3* (Capitao et al. 2011). Nie zidentyfikowano natomiast homologu genu *DCL-4*, pomimo ustalenia obecności tego genu u innych roślin motylkowatych (Bustos-Sanmamed et al. 2013).

Zadaliśmy sobie zatem pytania: **ile genów kodujących białka typu Dicer znajduje się w *M. truncatula*, jaki jest poziom ich ekspresji (mRNA) w różnych częściach rośliny, czy geny białek typu Dicer ulegają ekspresji w brodawkach korzeniowych?** Odpowiedzi na wszystkie powyższe pytania zostały zawarte w publikacji oryginalnej zatytułowanej **“*Six Medicago truncatula Dicer-like protein genes are expressed in plant cells and upregulated in nodules*”**.

Genom *M. truncatula* został przesekwencjonowany (Cannon et al. 2005; Young et al. 2005). Przeszukując aktualne bazy danych zawierające sekwencje genomowe *M. truncatula*, zidentyfikowaliśmy trzy nowe, dotychczas nieopisane geny, kodujące odpowiednio, *MtDCL-4* oraz dwa homologu *MtDCL-2*, w tym jeden wariant skrócony. Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie z sześciu badanych genów, *MtDCL-1*, trzy izoformy *MtDCL-2* (*-2a*, *-2b*, *-2c*), *MtDCL-3* oraz *MtDCL-4*, ulegają ekspresji na poziomie mRNA w *M. truncatula*, przy czym poziom ich ekspresji był różny w różnych, badanych częściach rośliny, tj. w korzeniach, liściach, łodydze, stożku wzrostu. Był on również inny w nasionach oraz w siewkach różniących się czasem wzrostu. Co ciekawe, okazało się, że w brodawkach

korzeniowych roślin symbiotycznych poziom ekspresji wszystkich zidentyfikowanych genów kodujących białka DCL znacząco wzrasta. W szczególności zaobserwowaliśmy ponad dwudziestokrotny wzrost poziomu mRNA jednej z izoform *MtDCL-2* (*MtDCL-2b*), w porównaniu do poziomu mRNA *MtDCL-2b* w korzeniach roślin kontrolnych oraz w korzeniach roślin traktowanych niesymbiotycznymi szczepami bakteryjnymi. Na podstawie otrzymanych wyników możemy sądzić, że rybonukleaza *MtDCL-2b* pełni ważną funkcję w procesie powstawania i/lub w funkcjonowaniu brodawek korzeniowych. Znaczące podwyższenie poziomu ekspresji *MtDCL-2b*, w porównaniu do poziomu ekspresji dwóch pozostałych izoform, wskazuje również, że warianty *MtDCL-2* mogą pełnić różne funkcje.

Ponadto, podczas klonowania puli uzyskanego cDNA, zidentyfikowaliśmy wariant transkrypcyjny genu *MtDCL-1*, w którym nie doszło do usunięcia intronu 14 (wariant będący produktem procesu alternatywnego składowania). Co ciekawe, podobny wariant transkryptu *DCL-1* zidentyfikowano wcześniej u *Arabidopsis* (Xie et al. 2003). W pierwotnym transkrypcie genu *Arabidopsis thaliana DCL-1* (*AtDCL-1* pre-mRNA), intron 14 tworzy strukturę typu spinki, która jest rozpoznawana i cięta przez produkt tego genu - białko *AtDCL-1*; spinka ta zawiera również sekwencję miR-838 (Rajagopalan et al. 2006). Obecnie sugeruje się, że w przypadku dużego stężenia *AtDCL-1* w jądrze komórkowym, białko to współzawodniczy z innymi białkami biorącymi udział w procesie składowania transkryptów, o wiązanie do *AtDCL-1* pre-mRNA. W wyniku związania białka *AtDCL-1* do intronu 14 własnego pre-mRNA, dochodzi do wycinania spinki zawierającej miR-838 i w konsekwencji do powstania skróconych transkryptów. Ostatecznie, nie dochodzi do produkcji białka *AtDCL-1* (proces negatywnej autoregulacji). Ewentualnie, jeśli takie skrócone transkrypty ulegają translacji, powstają niekompletne białka *AtDCL-1*, które, jak można przypuszczać, konkurują z kompletnymi *AtDCL-1* o wiązanie cząsteczek RNA i partnerów białkowych uczestniczących w procesie biogenezy miRNA (Rajagopalan et al. 2006). Nasze wstępne badania wykazały, że intron 14 *MtDCL-1* tworzy podobną strukturę spinkową jak intron 14 *AtDCL-1* i zawiera sekwencję homologiczną do *Ath* miR-838. Ponadto, zauważyliśmy, że intron 14 *MtDCL-1* zawiera kodon STOP, który znajduje się w ramce odczytu białka, co może skutkować powstawaniem skróconych form rybonukleazy *MtDCL-1*. Ponadto, jak wspomniałam na początku niniejszego podrozdziału, udało nam się zidentyfikować skrócony wariant genu *MtDCL-2* (*MtDCL-2c*); wariant ten koduje białko nieposiadające domeny

RNazy IIIb i dsRBD. W tym momencie chciałabym podkreślić, że w przypadku hDicer zidentyfikowano wiele wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1*, w tym warianty powstałe w wyniku alternatywnego składania, kodujące białka pozbawione niektórych domen. Co ciekawe, w komórkach ludzkich i u nicienia *C. elegans* odkryto skrócone formy Dicer, powstające w wyniku aktywności proteolitycznej kaspaz uwalnianych podczas procesu apoptozy. Problematyka ta została szczegółowo przedyskutowana w publikacji przeglądowej „*The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities*”.

Występowanie wariantów transkrypcyjnych genów kodujących białka typu Dicer, a także procesy prowadzące do powstawania skróconych form tych białek, to tylko niektóre ze sposobów regulacji ilości i aktywności białek z rodziny Dicer. Na podstawie zgromadzonych danych możemy przypuszczać, że mechanizmy tej regulacji mogą być podobne zarówno w świecie zwierząt, jak i roślin. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania, które umożliwią szczegółowe opisanie podobieństw i różnic dotyczących mechanizmów regulujących aktywność białek typu Dicer w królestwie roślin i zwierząt.

Perspektywy

Obecnie posiadamy konstrukty pozwalające na otrzymywanie MtDCL-1, -2, -3 oraz -4 w bakulowirusowym systemie ekspresji genów. Biorąc pod uwagę wyniki naszych dotychczasowych badań, w niedalekiej przyszłości chciałabym skupić się na problemie, czy krótkie RNA mogą również wpływać na aktywność roślinnych białek typu Dicer oraz na proces tworzenia roślinnych miRNA/siRNA, podobnie jak ma to miejsce w przypadku hDicer. Ponadto otrzymaliśmy konstrukty umożliwiające produkcję w systemach bakteryjnych domeny DUF283 z MtDCL-1, -2, -3 oraz -4. Chciałabym zatem ustalić, czy domeny DUF283, pochodzące z czterech różnych roślinnych białek typu Dicer, posiadają zdolność do wspierania parowania komplementarnych cząsteczek RNA lub DNA.

W ostatnim czasie byłam również zaangażowana w badania dotyczące strukturalnych aspektów procesu biogenezy krótkich regulatorowych RNA, w odniesieniu do roślinnego białka DCL-4 pochodzącego z *A. thaliana*, AtDCL-4. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez J. Doudna i wsp. (Macrae et al. 2006), długość fragmentów RNA produkowanych przez Dicer zależy od odległości jaka dzieli domeny RNazy III i PAZ. Co ciekawe, wyniki

naszych modelowań komputerowych wskazują, że odległość ta nie jest warunkowana długością helisy łączącej obie domeny, jak pierwotnie zakładano, a przestrzenną aranżacją domeny platformy, która w strukturze trzeciorzędowej lokuje się pomiędzy domeną PAZ i domenami RNazy III (***Modeling of the catalytic core of Arabidopsis thaliana Dicer-like 4 protein and its complex with double-stranded RNA***, praca w recenzji w: *Computational Biology and Chemistry*).

III. Osiągnięcia

Publikacje wchodzące w skład przedłożonego osiągnięcia naukowego zatytułowanego „***Rybonukleazy typu Dicer oraz czynniki zaangażowane w regulację ich aktywności ze szczególnym uwzględnieniem krótkich RNA***”, w których, w większości, jestem pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem:

1. Ujawniają, że w warunkach *in vitro* cząsteczki RNA mogą być nie tylko substratami, ale i regulatorami aktywności rybonukleazy hDicer. Krótkie RNA: (i) mogą wiązać hDicer (uniwersalne inhibitory hDicer), (ii) w przypadku posiadania sekwencji komplementarnych wobec prekursorów, mogą także oddziaływać z pre-miRNA (specyficzne inhibitory cięcia pre-miRNA przez hDicer). Tym samym zgromadzone dane wykazują, że aktywność rybonukleazowa hDicer może być regulowana przez krótkie cząsteczki RNA.
2. Pokazują, że hDicer w warunkach *in vitro* może wiązać szerokie spektrum jednoniciowych RNA o różnej sekwencji i różnej długości. Wydajnie wiązane są jednoniciowe RNA dłuższe niż 20-nt.
3. Stanowią udokumentowany wkład w badania dotyczące Dicer, w szczególności w kontekście regulacji jej aktywności przez krótkie RNA; wyniki naszych badań zostały szczegółowo przedyskutowane na łamach prestiżowego czasopisma, na tle obecnej wiedzy na temat Dicer, mechanizmu jej działania i regulacji jej aktywności.
4. Po raz pierwszy pokazują, że domena DUF283 hDicer może oddziaływać z kwasami nukleinowymi - ludzka DUF283 oddziałuje z jednoniciowymi RNA i DNA, nie oddziałuje natomiast z dwuniciowymi RNA i DNA.

5. Ujawniają, że zarówno ludzka DUF283, jak i kompletna hDicer wspierają w warunkach *in vitro* proces parowania sekwencji komplementarnych występujących w kwasach nukleinowych (tzw. ang. *annealing activity*). Zgromadzone dane pozwalają sądzić, iż hDicer pełni funkcję charakterystyczną dla białek opiekuńczych (ang. *chaperone like proteins*).
6. Proponują nową funkcję dla Dicer – bezpośredni udział w procesie potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Wyniki naszych badań ujawniają skomplikowaną naturę Dicer, której funkcje mogą sięgać daleko poza proces biogenezy srRNA.
7. Po raz pierwszy opisują sześć genów kodujących białka DCL w modelowej roślinie motylkowatej *M. truncatula*: *MtDCL-1*, *-2a*, *-2b*, *-2c*, *-3* and *-4*, w tym trzy geny zidentyfikowane przez nas (*MtDCL-2b*, *-2c* i *-4*), oraz charakteryzują ich ekspresję w różnych częściach rośliny. Dodatkowo wykazują, że ekspresja genów kodujących białka DCL jest znacząco podwyższona w brodawkach korzeniowych, w wyniku symbiozy *M. truncatula* z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Tym samym wyniki naszych badań ujawniają potencjalny udział białek DCL w procesie brodawkowania.
8. Sugerują, że występowanie różnych form Dicer (zarówno na poziomie mRNA jak i białka) może stanowić uniwersalny mechanizm regulacji poziomu oraz aktywności białek typu Dicer, zarówno w świecie roślin, jak i zwierząt. Przypuszczamy, że zidentyfikowany przez nas w *M. truncatula* wariant transkrypcyjny genu *MtDCL-1* (powstający w wyniku alternatywnego składania) może brać udział w tkankowo-specyficznej regulacji poziomu białka MtDCL-1.

Efektem przeprowadzonych badań są również rozwiązania praktyczne, opisane w załączonych patentach oraz w zgłoszeniach patentowych.

IV. Zastosowanie praktyczne

IV a. Oligomery RNA regulujące aktywność Dicer oraz proces uwalniania miRNA z ich prekursorów

Jednym z największych wyzwań stawianych współczesnym naukom biomedycznym jest projektowanie i otrzymywanie terapeutyków działających w sposób selektywny na określone cele biologiczne, np. i) związków niszczących wybiórczo komórki nowotworowe,

a niemających negatywnego wpływu na komórki zdrowe; ii) związków hamujących aktywność konkretnych białek i niewiążących białek charakteryzujących się podobną budową i funkcją do białka stanowiącego cel terapii. Strategia opisana w publikacji oryginalnej ***“A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer”*** umożliwia projektowanie cząsteczek regulatorowych, które zarówno w sposób uniwersalny, jak i wybiórczy mogą kontrolować proces dojrzewania, a także funkcjonowania wybranych (konkretnych) cząsteczek miRNA. Wierząc, iż zaproponowane przez nas rozwiązania otworzą drogę do opracowania nowych, specyficznych metod terapeutycznych, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu schorzeń wywołanych zmianą prawidłowego poziomu ekspresji wybranych cząsteczek regulatorowych (srRNA), np. w leczeniu chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, czy zakaźnych, wystąpiliśmy do polskiego, europejskiego oraz amerykańskiego Urzędu Patentowego o ochronę patentową naszego wynalazku:

Przedmiot ochrony: ***“Oligomer RNA, sposób regulowania procesu powstawania miRNA oraz zastosowanie oligomerów RNA jako regulatorów procesu powstawania miRNA”*** (ang. ***“An RNA oligomer, methods for regulating a microRNA production process and RNA oligomers used as microRNA production process regulators”***)

Autorzy: **A. Kurzyńska-Kokorniak**, N. Koralewska, A. Tyczewska, T. Twardowski, M. Figlerowicz;

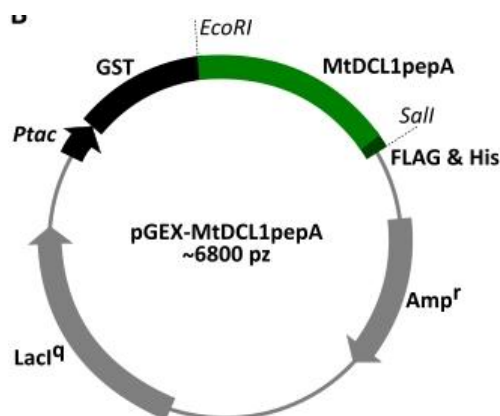
Zgłoszenia patentowe:

- Urząd Patentowy RP: P-398 211 (2012)
- Europejski Urząd Patentowy: PCT/PL2013/000024 (2013)
- Amerykański Urząd Patentowy: PCT/PL2013/000024 (2014)

IV b. Peptyd o aktywności enzymatycznej białka typu Dicer

Klonowanie cDNA, pochodzącego z procesu odwrotnej transkrypcji puli RNA izolowanej z młodych liści i szczytowej części pędu nadziemnego *M. truncatula*, umożliwiło uzyskanie sekwencji kodującej MtDCL-1. Sekwencja ta posłużyła do otrzymania konstruktów pozwalających na produkcję rekombinowanej, skróconej formy MtDCL-1 w komórkach bakteryjnych. Konstrukty do produkcji białka zawierały fragment sekwencji MtDCL-1 kodujący domeny, odpowiednio: PAZ, RNazy IIIa i IIIb oraz dwie domeny dsRBD

(MtDCL1pepA). Ponadto, do sekwencji MtDCL1pepA dołączono sekwencje (znaczniki) kodujące: peptyd S-transferazy glutationowej (znacznik GST), peptyd FLAG oraz znacznik heksahistydynowy (His), zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 5. Dołączone znaczniki umożliwiają oczyszczanie peptydu MtDCL1pepA metodami chromatografii powinowactwa, a także jego detekcję za pomocą przeciwciał specyficznych wobec peptydu FLAG.



Rycina 5. Schemat konstruktów kodujących MtDCL1pepA

Na podstawie opisu zgłoszenia patentowego „*Peptyd o aktywności enzymatycznej białka typu Dicer, sposób otrzymywania krótkich cząsteczek RNA oraz jego zastosowanie*”. Objaśnienia: Amp^r – gen oporności na ampicylinę, LacI^q – represor LacI, Ptac – promotor (hybrydowy promotor zawierający sekwencję promotora tryptofanowego oraz sekwencję promotora lacUV5), EcoRI, SalI – miejsca zawierające sekwencje rozpoznawane i cięte przez odpowiednie enzymy restrykcyjne. GST – sekwencja kodująca peptyd S-transferazy glutationowej, FLAG & His – sekwencje kodujące znaczniki: FLAG oraz heksahistydynowy.

Peptyd MtDCL1pepA otrzymywany był w szczepach ekspresyjnych *E. coli*. Wyizolowane białko oczyszczane było metodą chromatografii powinowactwa do glutationu i/lub niklu. Następnie, wykorzystując różne pre-miRNA oraz dsRNA, wykazaliśmy, że otrzymywany peptyd posiada aktywność rybonukleazową, charakterystyczną dla RNaz III. W każdym przypadku dochodziło do uwalniania specyficznych produktów, o długościach 23-25 nt. Szczegółowy opis konstrukcji plazmidu ekspresyjnego oraz produkcji charakterystycznych, krótkich RNA przez MtDCL1pepA zawarty został w rozwiązaniu zatytułowanym „*Peptyd o aktywności enzymatycznej białka typu Dicer, sposób otrzymywania krótkich cząsteczek RNA oraz jego zastosowanie*” (ang. “*Peptide with the enzymatic activity of a Dicer-like protein, a method for preparing short RNA molecules, and use thereof*”), które obecnie jest

przedmiotem ochrony patentowej otrzymanej zarówno na terenie Polski (Patent PL, nr 221404), jak i Stanów Zjednoczonych (Patent US, nr WO2013006069-A1; PL395495-A1; EP2726619-A1; US2014186895-A1; US9051559-B2). Otrzymywany peptyd jest z powodzeniem wykorzystywany do produkcji krótkich RNA o długości $\sim 24 \pm 1$ -nt.

V. Bibliografia

- Allen, E., Z. Xie, A. M. Gustafson, J. C. Carrington (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-21.
- Andersson, M. G., P. C. Haasnoot, N. Xu, S. Berenjian, B. Berkhout, G. Akusjarvi (2005). Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79: 9556-65.
- Berkhout, B., J. Haasnoot (2006). The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *FEBS Lett* 580: 2896-902.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-6.
- Bouche, N., D. Laressergues, V. Gasciolli, H. Vaucheret (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J* 25: 3347-56.
- Bustos-Sanmamed, P., J. Bazin, C. Hartmann, M. Crespi, C. Lelandais-Briere (2013). Small RNA pathways and diversity in model legumes: lessons from genomics. *Front Plant Sci* 4: 236.
- Cerutti, H., J. A. Casas-Mollano (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50: 81-99.
- Chakravarthy, S., S. H. Sternberg, C. A. Kellenberger, J. A. Doudna (2010). Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J Mol Biol* 404: 392-402.
- Chan, S. W., D. Zilberman, Z. Xie, L. K. Johansen, J. C. Carrington, S. E. Jacobsen (2004). RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303: 1336.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-4.
- Czech, B., C. D. Malone, R. Zhou, A. Stark, C. Schlingeheyde, M. Dus, N. Perrimon, M. Kellis, J. A. Wohlschlegel, R. Sachidanandam, et al. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. *Nature* 453: 798-802.
- Deleris, A., J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, O. Voinnet (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71.
- Dlagic, M. (2006). DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics* 22: 2711-4.
- Doyle, M., L. Badertscher, L. Jaskiewicz, S. Guttinger, S. Jurado, T. Hugenschmidt, U. Kutay, W. Filipowicz (2013). The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal. *RNA* 19: 1238-52.
- Drinneberg, I. A., G. R. Fink, D. P. Bartel (2011). Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science* 333: 1592.
- Ellington, A. D., J. W. Szostak (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-22.

- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105.
- Galiana-Arnoux, D., C. Dostert, A. Schneemann, J. A. Hoffmann, J. L. Imler (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat Immunol* 7: 590-7.
- Gascioli, V., A. C. Mallory, D. P. Bartel, H. Vaucheret (2005). Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 15: 1494-500.
- Gu, S., L. Jin, Y. Zhang, Y. Huang, F. Zhang, P. N. Valdmanis, M. A. Kay (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* 151: 900-11.
- Haase, A. D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol, W. Filipowicz (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6: 961-7.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-6.
- Heo, I., M. Ha, J. Lim, M. J. Yoon, J. E. Park, S. C. Kwon, H. Chang, V. N. Kim (2012). Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell* 151: 521-32.
- Jackowiak, P., M. Nowacka, P. M. Strozycski, M. Figlerowicz (2011). RNA degradome--its biogenesis and functions. *Nucleic Acids Res* 39: 7361-70.
- Kwak, P. B., Y. Tomari (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19: 145-51.
- Lamontagne, B., S. Larose, J. Boulanger, S. A. Elela (2001). The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol* 3: 71-8.
- Lau, P. W., K. Z. Guiley, N. De, C. S. Potter, B. Carragher, I. J. MacRae (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 19: 436-40.
- Lee, Y., I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh, V. N. Kim (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25: 522-32.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer, R. W. Carthew (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117: 69-81.
- Lima, W. F., H. Murray, J. G. Nichols, H. Wu, H. Sun, T. P. Prakash, A. R. Berdeja, H. J. Gaus, S. T. Crooke (2009). 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* 284: 2535-48.
- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde, M. Sattler (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426: 465-9.
- Liu, H., A. Matsugami, M. Katahira, S. Uesugi (2002). A dimeric RNA quadruplex architecture comprised of two G:G(:A):G:G(:A) hexads, G:G:G:G tetrads and UUUU loops. *J Mol Biol* 322: 955-70.
- Liz, J., A. Portela, M. Soler, A. Gomez, H. Ling, G. Michlewski, G. A. Calin, S. Guil, M. Esteller (2014). Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region. *Mol Cell* 55: 138-47.
- Lu, S., B. R. Cullen (2004). Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol* 78: 12868-76.

- Ma, E., I. J. MacRae, J. F. Kirsch, J. A. Doudna (2008). Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol* 380: 237-43.
- Ma, E., K. Zhou, M. A. Kidwell, J. A. Doudna (2012). Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing. *J Mol Biol* 422: 466-76.
- Ma, J. B., K. Ye, D. J. Patel (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429: 318-22.
- Macrae, I. J., F. Li, K. Zhou, W. Z. Cande, J. A. Doudna (2006). Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 73-80.
- Macrae, I. J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams, J. A. Doudna (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: 195-8.
- Martadinata, H., A. T. Phan (2009). Structure of propeller-type parallel-stranded RNA G-quadruplexes, formed by human telomeric RNA sequences in K⁺ solution. *J Am Chem Soc* 131: 2570-8.
- Martadinata, H., A. T. Phan (2013). Structure of human telomeric RNA (TERRA): stacking of two G-quadruplex blocks in K(+) solution. *Biochemistry* 52: 2176-83.
- Martadinata, H., A. T. Phan (2014). Formation of a stacked dimeric G-quadruplex containing bulges by the 5'-terminal region of human telomerase RNA (hTERC). *Biochemistry* 53: 1595-600.
- Michlewski, G., S. Guil, C. A. Semple, J. F. Caceres (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* 32: 383-93.
- Michlewski, G., J. F. Caceres (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1011-8.
- Mirihana Arachchilage, G., A. C. Dassanayake, S. Basu (2015). A potassium ion-dependent RNA structural switch regulates human pre-miRNA 92b maturation. *Chem Biol* 22: 262-72.
- Mlotshwa, S., G. J. Pruss, A. Peragine, M. W. Endres, J. Li, X. Chen, R. S. Poethig, L. H. Bowman, V. Vance (2008). DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS One* 3: e1755.
- Mukherjee, K., H. Campos, B. Kolaczowski (2012). Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Mol Biol Evol* 30: 627-41.
- Nicolas, F. E., S. Torres-Martinez, R. M. Ruiz-Vazquez (2013). Loss and retention of RNA interference in fungi and parasites. *PLoS Pathog* 9: e1003089.
- Nykanen, A., B. Haley, P. D. Zamore (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-21.
- Ota, H., M. Sakurai, R. Gupta, L. Valente, B. E. Wulff, K. Ariyoshi, H. Iizasa, R. V. Davuluri, K. Nishikura (2013). ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing. *Cell* 153: 575-89.
- Park, J. E., I. Heo, Y. Tian, D. K. Simanshu, H. Chang, D. Jee, D. J. Patel, V. N. Kim (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475: 201-5.
- Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson, O. Radmark (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 21: 5864-74.
- Qin, H., F. Chen, X. Huan, S. Machida, J. Song, Y. A. Yuan (2010). Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA* 16: 474-81.
- Song, J. J., J. Liu, N. H. Tolia, J. Schneiderman, S. K. Smith, R. A. Martienssen, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10: 1026-32.

- Tang, R., L. Li, D. Zhu, D. Hou, T. Cao, H. Gu, J. Zhang, J. Chen, C. Y. Zhang, K. Zen (2011). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res* 22: 504-15.
- Taylor, D. W., E. Ma, H. Shigematsu, M. A. Cianfrocco, C. L. Noland, K. Nagayama, E. Nogales, J. A. Doudna, H. W. Wang (2013). Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 20: 662-70.
- Tian, Y., D. K. Simanshu, J. B. Ma, J. E. Park, I. Heo, V. N. Kim, D. J. Patel (2014). A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Mol Cell* 53: 606-16.
- Tsutsumi, A., T. Kawamata, N. Izumi, H. Seitz, Y. Tomari (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol* 18: 1153-8.
- Viswanathan, S. R., G. Q. Daley, R. I. Gregory (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320: 97-100.
- Viswanathan, S. R., G. Q. Daley (2010). Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell* 140: 445-9.
- Xie, Z., K. D. Kasschau, J. C. Carrington (2003). Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 13: 784-9.
- Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen, J. C. Carrington (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: E104.
- Yan, K. S., S. Yan, A. Farooq, A. Han, L. Zeng, M. M. Zhou (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426: 468-74.
- Zhang, H., F. A. Kolb, V. Brondani, E. Billy, W. Filipowicz (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 21: 5875-85.
- Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118: 57-68.
- Zisoulis, D. G., Z. S. Kai, R. K. Chang, A. E. Pasquinelli (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature* 486: 541-4.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH.

A. Lista publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

1. Urbanowicz A, **Kurzyńska-Kokorniak A**, Jankowska A, Alejska M, Figlerowicz M (2012). *Low recombination activity of R region located at both ends of the HIV-1 genome*, Acta Biochim Pol. 59(4):619-26.

IF (2012) - 1.185 // Cyt. WoS – 0

2. Miazga A, Hamy F, Louvel S, Klimkait T, Pietrusiewicz Z, **Kurzyńska-Kokorniak A**, Figlerowicz M, Winska P, Kulikowski T (2011). *Thiated derivatives of 2',3'-dideoxy-3'-fluorothymidine: synthesis, in vitro anti-HIV-1 activity and interaction with recombinant drug resistant HIV-1 reverse transcriptase forms*, Antiviral Res. 92(1), 57-63.

IF (2011) - 4.301 // Cyt. WoS – 1

3. Jackowiak P, Figlerowicz M, **Kurzyńska-Kokorniak A**, Figlerowicz M (2011). *Mechanisms involved in the development of chronic hepatitis C as potential targets of antiviral therapy*, Curr Pharm Biotechnol. 12(11), 1774-80.

IF (2011) - 2.805 // Cyt. WoS – 6

4. **Kurzyńska-Kokorniak A**, Jackowiak P, Figlerowicz M, Figlerowicz M (2009). *Human- and virus-encoded microRNAs as potential targets of antiviral therapy*, Mini Rev Med Chem. 9(8), 927-37.

IF (2009) - 2.971 pkt. // Cyt. WoS – 11

5. **Kurzyńska-Kokorniak A**, Jamburuthugoda VK, Bibillo A, Eickbush TH (2007). *DNA-directed DNA polymerase and strand displacement activity of the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon*, J Mol Biol. 374(2), 322-33.

IF (2007) - 4.472 // Cyt. WoS – 23

6. M. Figlerowicz, M. Alejska, **A. Kurzyńska-Kokorniak**, M. Figlerowicz (2003). *Genetic variability-the key problem in prevention and therapy of RNA-based virus infections*, Medicinal Research Reviews 23(4), 488-518.

IF (2003) - 7.788 // Cyt. WoS – 34

7. M. Alejska, **A. Kurzyńska-Kokorniak**, M. Broda, R. Kierzek, M. Figlerowicz (2001). *How RNA viruses exchange their genetic material*, Acta Biochimica Polonica 48, 391-407.

IF (2001) - 0.832 // Cyt. WoS – 28

Sumaryczny IF publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **24.354**

Sumaryczny Impact Factor (IF) został obliczony na podstawie danych z Web of Science (WoS), zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji.

Publikacje w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie JCR

8. **Kurzynska-Kokorniak A**, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M (2014). *RNA oligomers as microRNA production process regulators*. Biotechnologia 95 (4):272-275.
9. Tworak A, Urbanowicz A, Koralewska N, Pokornowska M, **Kurzynska-Kokorniak A**, Podkowinski J, Figlerowicz M (2014). *Dicer-like proteins in Medicago truncatula, a model legume plant*. Biotechnologia 95 (1):120-121.
10. **Kurzyńska-Kokorniak A**, Figlerowicz M, Jackowiak P, Figlerowicz M (2004). *HIV – pochodzenie, cykl replikacyjny, leczenie*, Na pograniczu chemii i biologii, tom X:383-400, Red. H. Koroniak i J. Barciszewski.
11. **Kurzyńska-Kokorniak A**, Urbanowicz A, Jackowiak P, Jankowska A, Malinowska N, Alejska M, Figlerowicz M (2003). *Construction of the universal system for the in vitro studies of HIV-1 reverse transcriptase-mediated RNA recombination*, Annals of the Polish Chemical Society 2(1), 104-109.
12. **Kurzyńska-Kokorniak A**, Jaskólski M, Figlerowicz M (2002). *Reverse transcriptase – an enzyme generating the genetic variability of human immunodeficiency virus*, Biotechnologia 1(56), 24-34.

Zgłoszenia patentowe

13. **Kurzynska-Kokorniak A**, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M
- Urząd Patentowy RP: P-398 211 (2012) **“Oligomer RNA, sposób regulowania procesu powstawania miRNA oraz zastosowanie oligomerów RNA jako regulatorów procesu powstawania miRNA”**

- Europejski Urząd Patentowy: PCT/PL2013/000024 (2013) **“An RNA oligomer, methods for regulating a microRNA production process and RNA oligomers used as microRNA production process regulators”**
- Amerykański Urząd Patentowy: PCT/PL2013/000024 (2014) **“An RNA oligomer, methods for regulating a microRNA production process and RNA oligomers used as microRNA production process regulators”**

Publikacje naukowe w recenzji

1. Milewski MC, Kamel K, **Kurzyńska-Kokorniak A**, Chmielewski MK, Figlerowicz M. *EvOligo – a novel software to design and group libraries of oligonucleotides applicable for nucleic acid-based experiments*; w recenzji w: *Journal of Computational Biology*
2. Mickiewicz A, Sarzyńska J, Miłostan M, **Kurzyńska-Kokorniak A**, Rybarczyk A, Łukasiak P, Kuliński T, Figlerowicz M, Błazewicz J. *Modeling of the catalytic core of Arabidopsis thaliana Dicer-like 4 protein and its complex with double-stranded RNA*; w recenzji w: *Computational Biology and Chemistry*

B. Omówienie publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Dorobek po doktoracie

- I. Problematyka dotycząca zagadnienia *„Rybonukleazy typu Dicer oraz czynniki zaangażowane w regulację ich aktywności ze szczególnym uwzględnieniem krótkich RNA”*

Aspekty dotyczące projektowania i sposobu działania regulatorów RNA specyficznych wobec określonych pre-miRNA, tj. regulatorów procesu tworzenia określonych miRNA z pre-miRNA przez hDicer, zostały opisane w zgłoszeniach patentowych, odpowiednio:

Kurzyńska-Kokorniak A, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M

Oligomer RNA, sposób regulowania procesu powstawania miRNA oraz zastosowanie oligomerów RNA jako regulatorów procesu powstawania miRNA

Urząd Patentowy RP: P-398 211 (2012)

oraz

An RNA oligomer, methods for regulating a microRNA production process and RNA oligomers used as microRNA production process regulators

Europejski Urząd Patentowy: PCT/PL2013/000024 (2013)
oraz Amerykański Urząd Patentowy: PCT/PL2013/000024 (2014)

Mój wkład w powstanie ww. publikacji (zgłoszeń) polegał na współtworzeniu zarówno ogólnej jak i szczegółowej koncepcji badań naukowych, które doprowadziły do powstania rozwiązania będącego przedmiotem ww. zgłoszeń patentowych. Mój wkład w powstanie ww. zgłoszeń polegał także na zaplanowaniu doświadczeń i na udziale w części eksperymentalnej zaprezentowanej w zgłoszeniach oraz na napisaniu wstępnej wersji ww. zgłoszeń. Ponadto, uczestniczyłam w przygotowaniu wyjaśnień i odpowiedzi na uwagi zamieszczone w sprawozdaniach z urzędów patentowych. Brałam także udział w redakcji zastrzeżeń patentowych i byłam odpowiedzialna za końcowe wersje zgłoszeń. Opis wyników badań naukowych został zawarty w publikacji, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego „Rybonukleazy typu Dicer oraz czynniki zaangażowane w regulację ich aktywności ze szczególnym uwzględnieniem krótkich RNA”, zatytułowanej „A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer”.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

Ponadto, praktyczne aspekty dotyczące regulacji aktywności rybonukleazy hDicer oraz procesu powstawania miRNA z pre-miRNA z wykorzystaniem krótkich RNA, oraz opisy zgłoszeń patentowych zostały zawarte w opracowaniu:

Kurzyńska-Kokorniak A, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M (2014). Biotechnologia 95 (4):272-275

RNA oligomers as microRNA production process regulators

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zebraniu stosownych informacji dotyczących zgłoszeń patentowych oraz na napisaniu ww. opracowania.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

Dodatkowo, brałam udział w powstaniu opracowania, które opisuje i charakteryzuje białka typu Dicer zidentyfikowane w modelowej roślinie motylkowatej *M. truncatula*:

Tworak A, Urbanowicz A, Koralewska N, Pokornowska M, Kurzyńska-Kokorniak A, Podkowinski J, Figlerowicz M (2014). Biotechnologia 95 (1):120-121.

Dicer-like proteins in Medicago truncatula, a model legume plant

Mój wkład w powstanie tego opracowania polegał na zgromadzeniu odpowiednich danych literaturowych, brałam również udział w dyskusji otrzymanych wyników oraz w edycji opracowania.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

II. Problematyka dotycząca ludzkich wirusów RNA, przyczyn ich zmienności genetycznej oraz nowych strategii terapii przeciwwirusowych

Po powrocie ze stażu podoktorskiego zaangażowana byłam w badania dotyczące retrowirusa HIV-1, dokładniej, w poszukiwania i projektowanie nowych inhibitorów nukleozydowych/nukleotydowych, które mogą hamować proces replikacji HIV-1 (syntezę DNA katalizowaną przez wirusową odwrotną transkryptazę, HIV-1 RT). Badania te prowadzone były w ramach międzynarodowego projektu „*Preparation and identification of new HIV reverse transcriptase inhibitors targeted against HIV strains resistant to anti-HIV/AIDS drugs*” (HIV ResInh) i zaowocowały powstaniem dwóch publikacji oryginalnych:

Miazga A, Hamy F, Louvel S, Klimkait T, Pietrusiewicz Z, Kurzyńska-Kokorniak A, Figlerowicz M, Winska P, Kulikowski T (2011). Antiviral Res. 92(1), 57-63

Thiated derivatives of 2',3'-dideoxy-3'-fluorothymidine: synthesis, in vitro anti-HIV-1 activity and interaction with recombinant drug resistant HIV-1 reverse transcriptase forms

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na napisaniu paragrafu „Generation of reverse transcriptase mutants”. Brałam również udział w zaprojektowaniu wektorów służących do ekspresji zmutowanych form odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 (HIV-1 RT). Uczestniczyłam także w badaniach aktywności enzymatycznej HIV-1 RT i jej zmutowanych form oraz w testowaniu potencjału inhibitorowego otrzymanych pochodnych nukleotydowych wobec HIV-1 RT i jej mutantów. Brałam, również udział w edycji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

oraz

Urbanowicz A, Kurzyńska-Kokorniak A, Jankowska A, Alejska M, Figlerowicz M (2012). Acta Biochim Pol. 59(4):619-26

Low recombination activity of R region located at both ends of the HIV-1 genome

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w doświadczeniach dotyczących aktywności rekombinazowej HIV-1 RT, których rezultaty zostały zaprezentowane na Rysunkach 3 i 4. Brałam również udział w analizie i interpretacji wyników oraz w edycji manuskryptu. Ponadto, uczestniczyłam w przedyskutowaniu otrzymanych recenzji oraz w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy szacuję na co najmniej 20%.

Ponadto, wiedza zdobyta podczas realizacji projektu HIV ResInh zaowocowała powstaniem dwóch prac przeglądowych:

Kurzyńska-Kokorniak A, Jackowiak P, Figlerowicz M, Figlerowicz M (2009). Mini Rev Med Chem. 9(8), 927-37.

Human- and virus-encoded microRNAs as potential targets of antiviral therapy

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zgromadzeniu danych literaturowych oraz na napisaniu rozdziałów: *Introduction, miRNA biogenesis and function, Role of cellular miRNAs in host-virus interactions, Human and virus-encoded miRNAs as potential targets of antiviral therapy, Potential agents modulating miRNA pathways, Conclusions*. Ponadto, jestem współautorem wszystkich rysunków. Brałam również udział w edycji manuskryptu, uczestniczyłam także w przedyskutowaniu otrzymanych recenzji oraz w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

oraz

Jackowiak P, Figlerowicz M, Kurzyńska-Kokorniak A, Figlerowicz M (2011). Curr Pharm Biotechnol. 12(11), 1774-80.

Mechanisms involved in the development of chronic hepatitis C as potential targets of antiviral therapy

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zgromadzeniu danych literaturowych oraz na napisaniu rozdziału „miR-122 – Enhancer of HCV RNA replication”. Brałam również udział w edycji manuskryptu. Ponadto, uczestniczyłam w przedyskutowaniu otrzymanych recenzji oraz w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział procentowy szacuję na co najmniej 10%.

III. Problematyka dotycząca ruchomych elementów genetycznych – retrotranspozonów typu „non-LTR”

Badania prowadzone podczas dwuletniego stażu podoktorskiego w laboratorium prof. T. Eickbush’a (Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA) dotyczyły problemu transpozycji ruchomych elementów genetycznych, retrotranspozonów typu „non-LTR” – czyli retrotranspozonów nieposiadających długich powtórzeń końcowych (LTR - ang. *Long Terminal Repeats*). Retrotranspozycja może być przyczyną chorób genetycznych, jeśli integracja ruchomego elementu genetycznego następuje w obrębie genu i prowadzi do jego uszkodzenia. Szczegóły procesu retrotranspozycji elementów typu "non-

LTR" nie zostały w pełni poznane, wiadomo jednak, iż kluczowym enzymem, który uczestniczy w tym procesie jest odwrotna transkryptaza kodowana przez retrotranspozony. Odwrotne transkryptazy odpowiedzialne są za syntezę dsDNA na matrycy RNA, przy czym synteza ta zachodzi w kilku etapach: (i) synteza DNA na matrycy RNA, (ii) usuwanie RNA z powstałego hybrydu RNA/DNA oraz (iii) synteza drugiej nici DNA na nowopowstałej matrycy DNA.

Moje zadanie polegało na produkcji odwrotnej transkryptazy kodowanej przez element R2 (retrotranspozon typu "non-LTR") oraz na scharakteryzowaniu jej aktywności biochemicznych. W szczególności, wykazałam, że odwrotna transkryptaza R2 posiada aktywność polimerazy DNA zależnej od matrycy DNA, przy czym synteza DNA na matrycy DNA i proces usuwania nici RNA z hybrydu DNA/RNA zachodzą wg tzw. „mechanizmu wypierania nici” (ang. *strand displacement synthesis*). Co ciekawe, odwrotne transkryptazy kodowane przez retrowirusy (np. HIV-1) posiadają aktywność RNazy H, która usuwa nić RNA z hybrydu RNA/DNA. Odwrotna transkryptaza R2 takiej aktywności nie posiada. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej:

Kurzyńska-Kokorniak A, Jamburuthugoda VK, Bibillo A, Eickbush TH (2007). J Mol Biol. 374(2), 322-33.

DNA-directed DNA polymerase and strand displacement activity of the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon.

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na produkcji odwrotnej transkryptazy R2, na zaplanowaniu wszystkich doświadczeń oraz na wykonaniu wszystkich doświadczeń, polegających na badaniu aktywności enzymatycznej odwrotnej transkryptazy R2, których wyniki zostały zamieszczone na Rysunkach: 1-4 oraz 6-8. Ponadto, uczestniczyłam w analizie, interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników. Napisałam także wstępną wersję manuskryptu. Brałam również udział w edycji manuskryptu oraz uczestniczyłam w przedyskutowaniu otrzymanych recenzji.

Mój udział procentowy szacuję na co najmniej 50%.

Dorobek przed doktoratem

Moja rozprawa doktorska dotyczyła problematyki związanej ze zmiennością genetyczną retrowirusa HIV-1 i roli odwrotnej transkryptazy HIV-1 (HIV-1 RT) w generowaniu tejże zmienności. HIV-1 RT jest odpowiedzialna zarówno za nieprecyzyjną replikację genomów wirusowych, jak i za ich genetyczną rekombinację. Nieprecyzyjna replikacja może prowadzić do powstawania mutacji punktowych, natomiast genetyczna rekombinacja jest przyczyną większych rearanżacji w obrębie genomowych, wirusowych RNA. Oba te procesy są odpowiedzialne za tak dużą zmienność genetyczną HIV-1, tj. powstawanie wirusów

różniących się sekwencją genomowego RNA. Wśród powstających wariantów HIV-1 znajdują się warianty, które są odporne na stosowane terapie przeciwwirusowe; warianty te podlegają pozytywnej selekcji i namnażaniu w organizmie gospodarza. Badania przeprowadzone w ramach realizacji pracy doktorskiej oraz wiedza zdobyta w tym okresie zaowocowały powstaniem pięciu publikacji:

- Alejska M, Kurzyńska-Kokorniak A, Broda M, Kierzek R, Figlerowicz M (2001). Acta Biochimica Polonica 48, 391-407.

How RNA viruses exchange their genetic material

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na wykonaniu Rysunku 6, który dotyczy rekombinacji niehomologicznej wspieranej przez odwrotną transkryptazę HIV-1 oraz na pomocy w przygotowaniu i złożeniu całej pracy, oraz pozostałych rysunków. Ponadto, brałam udział w edycji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 20%.

- Kurzyńska-Kokorniak A, Jaskólski M, Figlerowicz M (2002). Biotechnologia 1(56), 24-34.

Reverse transcriptase – an enzyme generating the genetic variability of human immunodeficiency virus

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zgromadzeniu danych literaturowych, napisaniu wstępnej wersji całego manuskryptu oraz na przygotowaniu wszystkich rysunków.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

- Kurzyńska-Kokorniak A, Urbanowicz A, Jackowiak P, Jankowska A, Malinowska N, Alejska M, Figlerowicz M (2003). Annals of the Polish Chemical Society 2(1), 104-109.

Construction of the universal system for the in vitro studies of HIV-1 reverse transcriptase-mediated RNA recombination

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na produkcji odwrotnej transkryptazy HIV-1 RT oraz na opracowaniu i stworzeniu uniwersalnego systemu do testowania aktywności HIV-1 RT (aktywności polimerazowej, RNazowej oraz rekombinazowej). Ponadto, byłam odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczeń, dotyczących badania aktywności HIV-1 RT, których wyniki zostały zaprezentowane na Rysunkach 1-4 oraz 6. Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał również na napisaniu wstępnej wersji całego manuskryptu oraz na przygotowaniu rysunków.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

- Figlerowicz M, Alejska M, Kurzyńska-Kokorniak A, Figlerowicz M (2003). Medicinal Research Reviews 23(4), 488-518.

Genetic variability-the key problem in prevention and therapy of RNA-based virus infections

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zgromadzeniu części danych literaturowych oraz na opracowaniu i przygotowaniu rysunków, które dotyczyły procesu replikacji wirusów RNA: Rys. 4, 7 oraz 9. Brałam również udział w edycji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- Kurzyńska-Kokorniak A, Figlerowicz M, Jackowiak P, Figlerowicz M (2004). Na pograniczu chemii i biologii, tom X:383-400, Red. H. Koroniak i J. Barciszewski.

HIV – pochodzenie, cykl replikacyjny, leczenie

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na zgromadzeniu danych literaturowych, napisaniu wstępnej wersji całego manuskryptu oraz na przygotowaniu wszystkich rysunków.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

C. Dane bibliometryczne

Indeks Hirscha (**WoS**): 6

Łączna liczba cytowań (**WoS**): 118 (bez autocytaowań: 99)

Łączny sumaryczny IF (**WoS**): 49.599

Sumaryczny Impact Factor (IF) został obliczony na podstawie danych z Web of Science (WoS), zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji.

D. Udział w projektach naukowych

Kierownictwo projektów naukowych

2011 – 2015 „*Apta-miRs: novel strategy for controlling miRNA's biogenesis and functioning*”

- projekt współfinansowany z funduszy Unii Europejskiej przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu POMOST (POMOST/2011-3/5);
miejsce wykonywania: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
(kierownik projektu)

2009 – 2012 *„Krótkie cząsteczki RNA jako regulatory aktywności enzymatycznej ludzkiej rybonukleazy Dicer”*

- projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Nauki (ID: 43582); miejsce wykonywania: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (**kierownik projektu**)

Wykonawca w projektach naukowych

2010 – 2015 *“Opracowanie innowacyjnej technologii syntezy fragmentów RNA oraz konstrukcji mikromacierzy RNA”* (ang. “*Elaboration of innovative technology for RNA synthesis and RNA microarray construction*”)
- projekt współfinansowany z funduszy Unii Europejskiej (UDA-POIG.01.03.01-30-045/09) – Narodowe Centrum Badań i Rozwoju; miejsce wykonywania: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (**wykonawca**)

2007 – 2010 *„Preparation and identification of new HIV reverse transcriptase inhibitors targeted against HIV strains resistant to anti-HIV/AIDS drugs”* (HIV ResInh)
- projekt współfinansowany z funduszy Unii Europejskiej w Szóstym Programie Ramowym Komisji Europejskiej (FP6-037760); miejsce wykonywania: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (**wykonawca**)

2005 – 2007 *„Retrotransposon Expression Within Ribosomal Gene Loci”*
- project finansowany przez National Institutes of Health, Public Health Services Grant (GM42790); miejsce wykonywania: Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA (**wykonawca**)

2002 – 2004 *„Badania roli odwrotnej transkryptazy w generowaniu zmienności genetycznej wirusa HIV”*
- projekt finansowany przez Komitet Badań Naukowych; miejsce wykonywania: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (**grant promotorski**)

E. Wykłady/ referaty na zaproszenie (w j. angielskim)

2015 *„Regulation of miRNA biogenesis by short RNA molecules”*; RNA Interference, MicroRNAs & Single Cell Biology - 2015 Meeting; Boston, MA, USA

- 2014** „*Apta-miRs: novel strategy for controlling miRNA's biogenesis and functioning*”; Spring 2014 Genome Biology Group Meetings; University of Texas, Department of Biology, Arlington, TX, USA
- 2013** „*RNA as a regulator of human ribonuclease Dicer activity*”; Towards a new RNA World; 25th Anniversary IBCH PAN, Poznań, Polska
- 2012** „*Regulation of human ribonuclease Dicer activity by short RNAs*”; International Symposium ESF-EMBO: “Antiviral RNAi: From Molecular Biology Towards Applications”; Pułtusk, Polska
- 2011** „*Modulation of microRNA biogenesis by using short oligo-RNA molecules*”, XV Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska

F. Działalność dydaktyczna

Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim

1. **mgr Natalia Koralewska:** „*Krótkie cząsteczki kwasów nukleinowych jako regulatory procesu uwalniania mikroRNA z ich prekursorów*”; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (od **2010**; otwarcie przewodu: **2013**; planowany termin obrony: 2016)

Doktorantka finansowana w latach 2011-2014 z projektu POMOST Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (kierownik: A. Kurzyńska-Kokorniak).

2. **mgr inż. Maria Pokornowska:** „*Identyfikacja i charakterystyka domen ludzkiej rybonukleazy Dicer zaangażowanych w oddziaływanie z oligomerami RNA*”; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (od **2012**; otwarcie przewodu: **2015**, planowany termin obrony: 2017)
3. **mgr Weronika Hoffmann:** „*Aktywność rekombinowanej rybonukleazy DICER w kontekście infekcji herpeswirusowej*”; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed, Gdańsk (od **2012**; otwarcie przewodu: **2016**, planowany termin obrony: 2017)
4. **mgr Marek Cezary Milewski:** „*Projektowanie dedykowanych bibliotek oligonukleotydowych i ich wykorzystanie w badaniach funkcji RNA i DNA*”; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (od **2011**; otwarcie przewodu: **2016**, planowany termin obrony: 2017)

Opiekun naukowy doktorantów

5. **mgr Rafał Maksym (2010 – 2011)** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

6. **mgr Zofia M Pietrusiewicz (2007 - 2010)** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

7. **mgr Agata Tyczewska (2003 -2004)** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Opiekun naukowy tzw. „postdoków”

8. **dr Varuni Jamburuthugoda (2006 – 2007)** - Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA

Opiekun naukowy magistrantów

Natalia Koralewska (2008-2010), Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu; **Paulina Jackowiak** (2002-2004), Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu; **Renata Czolgosh** (2001-2003), Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Promotor pracy inżynierskiej

inż. Maciej Bętkowski (2011-2012): „*Mechanizmy regulujące powstawanie mikroRNA u człowieka*”; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek: Biotechnologia

Recenzent pracy inżynierskiej

inż. Dawid Owsian (2014): „*Przygotowanie wektorów służących do produkcji roślinnych rybonukleaz DCL1 i DCL2 w komórkach owadzych*”; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek: Biotechnologia

G. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

- **Department of Biology, University of Texas, Arlington, TX, USA** – wizyta naukowa u prof. S. M. Christensen’a w ramach realizacji projektu POMOST Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (**marzec 2014**)
- **Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA** – staż podoktorski u prof. T. H. Eickbush’a, udział w projekcie: „*Retrotransposon Expression Within Ribosomal Gene Loci*”, project finansowany przez National Institutes of Health, Public Health Services Grant (**04.2005-02.2007**)

H. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

- Wyróżnienie za osiągnięcia naukowe w latach **2014-2015** przez Komisję Rady Naukowej ICHB PAN
- Wyróżnienie w postaci publikacji "*Laboratorium pomysłów*", ACADEMIA (2011), Nr 4 (28):38-39 (cykl poświęcony kobietom w nauce)
- Wyróżnienie publikacji „*Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro*” (2011), Nucleic Acid Ther. 21(5), 333-46 (Tyczewska A*, Kurzyńska-Kokorniak A*, et al.), przez F. Steele’a, edytora *Nucleic Acid Therapeutics* - jedna z najciekawszych prac eksperymentalnych opublikowanych w Nucleic Acid Ther., w roku 2011
- NAR AWARD (2010) – nagroda za wybitną prezentację posterową: “*Dicer inhibitors as potential antiviral agents*” przedstawioną na konferencji ESF-EMBO “*Applications of antiviral RNA interference (RNAi)*”, Sant Feliu de Guixols, Hiszpania
- Wyróżnienie pracy doktorskiej (2004) - praca doktorska nagrodzona wyróżnieniem przez Radę Naukową ICHB PAN

Szczegółowe informacje dotyczące osiągnięć dydaktycznych, współpracy naukowej, odbytych staży i działalności popularyzującej naukę habilitantki znajdują się w Załączniku nr 4.

Anna Kurzyńska-Kokorniak