

STRESZCZENIE

Rybonukleaza Dicer jest znana przede wszystkim z kluczowej roli, jaką odgrywa w procesie biogenezy krótkich regulatorowych RNA: miRNA oraz siRNA. Badania prowadzone w ostatnich latach znacząco wzbogaciły wiedzę dotyczącą funkcji pełnionych przez Dicer. Wykazano, że Dicer jest zaangażowana w metabolizm zróżnicowanej puli RNA, m.in. tRNA i snoRNA, usuwanie potencjalnie cytotoksycznych cząsteczek RNA oraz utrzymywanie stabilności genomu. Co więcej, podczas apoptozy, w następstwie cięcia proteolitycznego przez kaspazy, fragment Dicer staje się deoksyrybonukleazą i bierze udział w degradacji genomowego DNA. Odkrycie mechanizmu pasywnego wiązania RNA przez Dicer oraz jej aktywności opiekuńczych wobec kwasów nukleinowych wykazało, że Dicer może dodatkowo pełnić funkcje niezwiązane z hydrolizą kwasów nukleinowych. W tym artykule podsumowujemy aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcjonowania ludzkiej rybonukleazy Dicer, uwzględniając kanoniczną rolę enzymu w biogenezie miRNA oraz nowo odkrywane obszary jej aktywności.

WPROWADZENIE

Rybonukleaza Dicer została po raz pierwszy opisana jako enzym zaangażowany w początkowe etapy procesu interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) w 2001 roku [1]. Dicer należy do rodziny rybonukleaz III (RNaz III), będących endorybonukleazami wykazującymi powinowactwo do dwuniciowych RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*) [2]. Białka z tej rodziny posiadają jedną bądź dwie domeny rybonukleazowe nazywane domenami RNazy III (RIII) z charakterystycznym motywem ERLEFLGD występującym w centrum aktywnym enzymu. RNazy III katalizują hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w dwuniciowych rejonach cząsteczek RNA, a produktami tej reakcji są duplekisy RNA posiadające dwa niesparowane nukleotydy z grupą hydroksylową na końcu 3' oraz grupę fosforanową na końcu 5' [3].

Stosując kryterium strukturalne, RNazy III dzieli się na trzy klasy (Ryc. 1). Do klasy I należą najprostsze białka posiadające pojedynczą domenę RIII oraz domenę wiążącą dsRNA (dsRBD, ang. *dsRNA binding domain*), zidentyfikowane u bakterii, eubakterii i grzybów. Ponieważ centrum aktywne RNaz III tworzą dwie domeny RIII, w przypadku enzymów klasy I dla uzyskania aktywności hydrolitycznej konieczna jest dimeryzacja białek [4]. Białka klasy II i III występują w organizmach eukariotycznych i charakteryzują się bardziej złożoną budową niż białka klasy I; posiadają dwie domeny RIII, domenę dsRBD oraz domenę typu PAZ (domena obecna w białkach: Piwi, Argonaute, Zwillie). Białka te mogą posiadać także dodatkowe domeny, które są charakterystyczne dla danych grup RNaz w obrębie poszczególnych klas. Typowym przedstawicielem klasy II jest ludzka rybonukleaza Drosha, natomiast klasy III – ludzka Dicer.

Homologi Dicer występują powszechnie w organizmach eukariotycznych. Analizy filogenetyczne wskazują, że gen Dicer uległ duplikacji na wczesnych etapach ewolucji eukariontów, a następnie podlegał niezależnej dywersyfikacji u roślin, zwierząt i grzybów. Procesy te zbiegły się w czasie z pojawieniem się potrzeby bardziej złożonej kontroli ekspresji genów w związku z rozwojem w tych królestwach organizmów wielokomórkowych [5]. Proces dywergencji doprowadził do wykształcenia się u roślin czterech rodzajów białek typu Dicer (DCL, ang. *Dicer-like proteins*): DCL-1, DCL-2, DCL-3 i DCL-4, natomiast u zwierząt – Dicer-1 i Dicer-2. Co więcej, gen kodujący Dicer-2, czyli białko zaangażowane w odpowiedź przeciwwirusową m.in. u owadów, nie został zidentyfikowany w tych liniach ewolucyjnych zwierząt, w których rozwinęły się alternatywne mechanizmy obronne (np. u kręgowców) lub nie występuje presja środowiskowa w związku z ograniczoną liczbą naturalnych patogenów (np. u nicieni). Zgodnie z tym, u człowieka występuje tylko jedna izoforma Dicer kodowana przez gen *DICER1*.

dr Natalia Koralewska¹,
mgr Kinga Ciechanowska¹,
mgr inż. Maria Pokornowska¹,
prof. dr hab. Marek
Figlerowicz^{1,2},

dr hab. Anna Kurzyńska-
Kokorniak¹✉

¹Institut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

²Institut Informatyki, Politechnika Poznańska, Poznań

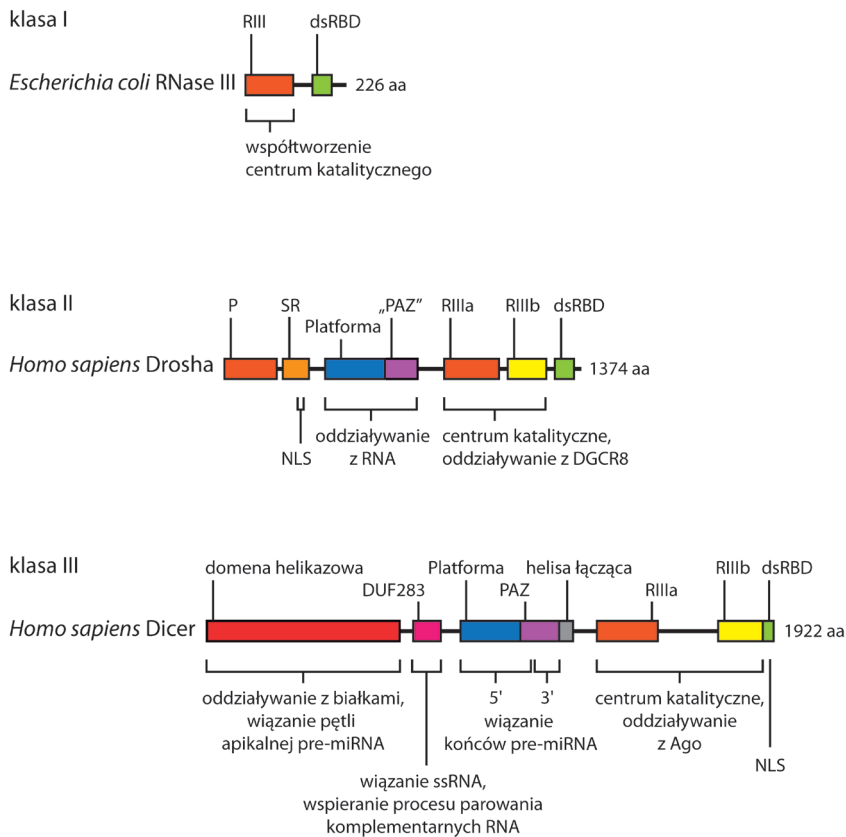
https://doi.org/10.18388/pb.2019_267

✉ autor korespondujący: akurzyns@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: rybonukleaza Dicer, regulatorowe RNA, biogeneza miRNA, białko opiekuńcze

Wykaz skrótów: dsRBP – białko wiążące dwuniciowy RNA (ang. *dsRNA binding protein*); dsRBD – domena wiążąca dwuniciowy RNA (ang. *dsRNA binding domain*); miRNA – mikroRNA (ang. *microRNA*); ncRNA – niekodujący RNA (ang. *non-coding RNA*); NLS – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localisation signal*); pre-miRNA – prekursor miRNA; (ang. *precursor miRNA*); pri-miRNA – pierwotny transkrypt miRNA (ang. *primary miRNA*); RISC – kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA induced silencing complex*); RNAi – interferencja RNA (ang. *RNA interference*); srRNA – (ang. *small regulatory RNA*, srRNA)

Podziękowania: Niniejsza praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (Grant SONATA BIS nr 2016/22/E/NZ1/00422).



Rycina 1. Schematyczna reprezentacja budowy białek należących do rodziny rybonukleaz III

dsRBD – domena wiążąca dsRNA; NLS – sygnał lokalizacji jądrowej; P – domena bogata w prolinę; PAZ – domena obecna w białkach: Piwi, Argonaute, Zwillie; RIII – domena RNazy III; SR – domena bogata w serynę i arginę.

Ludzka Dicer, podobnie jak inne zwierzęce Dicer, występuje przede wszystkim w cytoplazmie, w strefie okołojądrowej, gdzie odpowiada za dojrzewanie krótkich regulatorowych RNA (ang. *small regulatory RNA*, srRNA): mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*) oraz małych interferencyjnych RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) [6]. Udział w procesie biogenezy srRNA jest najlepiej poznaną rolą rybonukleazy Dicer, postrzeganą jako kanoniczna funkcja tego enzymu. Istnieją jednak doniesienia literaturowe wskazujące na udział Dicer w innych istotnych procesach biologicznych, np. w apoptozie [7] oraz w procesach zapalnych [8]. Poniżej podsumowujemy aktualny stan wiedzy na temat ludzkiej Dicer – jej struktury, mechanizmów regulujących jej powstawanie i funkcjonowanie oraz roli tego enzymu w rozmaitych procesach komórkowych.

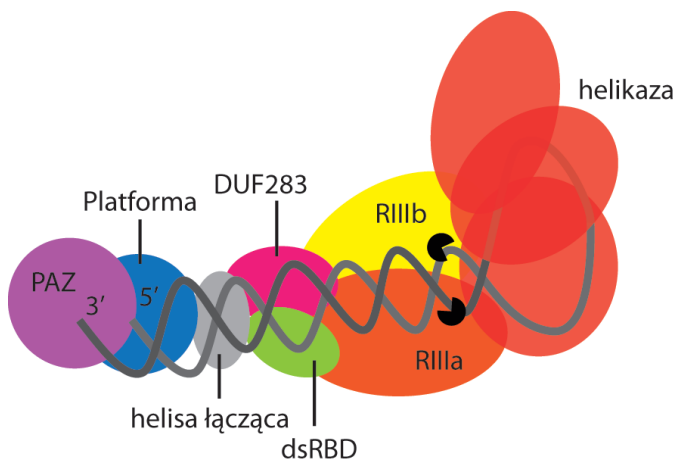
BUDOWA I MODEL FUNKCJONOWANIA DICER

Dicer jest wielodomenowym białkiem o wysoce zachowawczej strukturze. Ludzka Dicer o masie ~220 kDa zbudowana jest z 1922 aminokwasów (aa., ang. *amino acids*), które tworzą kolejno następujące po sobie domeny: N-końcową domenę helikazową, domenę o nieznanym celu – DUF283 (ang. *domain of unknown function 283*), domeny: Platformę i PAZ, helisę łączącą (ang. *connector helix*), dwie domeny RNazy III (RIIIa i RIIIb) oraz C-końcową domenę dsRBD [3] (Ryc. 1). Domeny: Platforma i PAZ wraz z helisą łączącą są często określane jako kasetta PPC (ang. *Platform-PAZ-Con-*

necter helix) [9]. W roku 2018 grupa profesora Wang przedstawiła strukturę kompleksu ludzkiej Dicer z prekursorem miRNA (pre-miRNA, ang. *precursor miRNA*), otrzymaną dzięki wykorzystaniu mikroskopii krio-elektronowej [10]. Ponadto znane są struktury krystaliczne niektórych fragmentów ludzkiej Dicer: domeny RIIIb [11], polipeptydu o długości 300 aa., obejmującego Platformę i PAZ wraz z rejonami oskrzydłowymi [12] oraz środkowej części domeny helikazowej (132 aa.) [13].

Cząsteczka rybonukleazy Dicer o długości ~160 Å i szerokości ~115 Å przypomina kształtem literę „L”, z tandemem domen RNazy III u podstawy oraz domeną PAZ na przeciwległym końcu (Ryc. 2). Badania strukturalne wskazują, że podczas wiązania substratu dochodzi do znacznych zmian konformacyjnych obejmujących całą cząsteczkę białka. Duża elastyczność struktury enzymu umożliwia wiązanie RNA o zróżnicowanej budowie. Wiodącą rolę w oddziaływaniu z substratem pre-miRNA odgrywa domena PAZ, która rozpoznaje i wiąże dwunukleotydowy wystający koniec 3' [4]. Grupa fosforanowa na końcu 5' RNA dokowana jest w kieszeni tworzonej w obrębie Platformy i PAZ. Wiązanie RNA wspierane jest także przez dsRBD

[14]. Ponadto domena helikazowa zaangażowana jest w oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA, co umożliwia dopasowanie substratu do centrum katalitycznego oraz pozwala na dyskryminację pomiędzy substratami pre-miRNA i dsRNA [14]. Domena helikazowa odgrywa również rolę regulatorową, służąc jako platforma kontaktu z białkami modulującymi aktywność Dicer [15,16]. Badania *in vitro* wykazały, że usunięcie tej domeny zwiększa procesywność enzymu, co wskazuje na jej zdolność do autoinhibicji funkcjonowania Dicer [17]. Mimo że domena ta zawiera motyw DExD/H-box odpowiedzialny za wiązanie ATP, jak dotąd nie wykazano, aby jej aktywność była zależna od ATP. Dicer posiada pojedyncze centrum katalityczne tworzone przez wewnątrzcząsteczkowy heterodimer domen RNazowych, które jednak działają niezależnie od siebie. Domena RIIIa jest większa od RIIIb i hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w obrębie ramienia 3' pre-miRNA, odpowiednio – RIIIb tnie ramię 5' prekursora. Reakcja katalizowana przez Dicer jest zależna od jonów Mg^{2+} koordynowanych w centrum aktywnym enzymu. Produktem hydrolizy jest dupleks RNA z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcu 3' i grupą fosforanową na końcu 5'. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez grupę profesor Doudny [18], długość fragmentów RNA produkowanych przez Dicer (~20 pz) zależy od odległości jaka dzieli centrum aktywne enzymu i domenę PAZ. Co więcej, wyniki modelowania molekularnego wskazują, że dystans ten zależy od przestrzennej aranżacji



Rycina 2. Schemat budowy ludzkiej Dicer przedstawiający przestrzenne ułożenie poszczególnych domen

Kolorem fioletowym zaznaczono domenę PAZ, kolorem niebieskim - towarzyszącą jej domenę Platformy; na szaro zaznaczono domenę helisy łączącej; na pomarańczowo i żółto dwie domeny RNazy III, RIIIA i RIIIb, odpowiednio; kolorem zielonym domenę dsRBD; różowym domenę DUF283; kolorem czerwonym oznaczono N-końcową domenę helikazową. Szara helisa reprezentuje cząsteczkę pre-miRNA. Na czarno zaznaczono miejsca cięcia pre-miRNA A przez Dicer. Schemat stworzony na podstawie Taylor i wsp. oraz Liu i wsp. [58,94].

domeny Platformy, która w strukturze trzeciorzędowej lokuje się pomiędzy domeną PAZ i domenami RNazy III [19]. Funkcja domeny DUF283 nie została jeszcze jednoznacznie wyjaśniona. Badania *in vitro* domeny DUF283 wykazały jej zdolność do wiązania ssRNA oraz wspierania hybrydyzacji komplementarnych nici kwasów nukleinowych, co mogłoby wskazywać na funkcje opiekuńcze Dicer [20], o czym będzie mowa w dalszej części artykułu. Sugeruje się również zaangażowanie DUF283 w oddziaływanie z białkami regulującymi aktywność Dicer [21].

STRUKTURA GENU KODUJĄCEGO LUDZKĄ DICER I REGULACJA JEGO EKSPRESJI

Lokalizacja chromosomowa i struktura genów Dicer różnią się w zależności od gatunku. U człowieka, *DICER1* (ENSG00000100697) znajduje się na długim ramieniu chromosomu 14, w rejonie subteleromowym (14q32.13) i składa się z 26 egzonów kodujących białko. *DICER1* uznawany jest za gen metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*), choć w porównaniu do innych genów tego typu charakteryzuje się znacznie dłuższym rejonem 3' UTR (>4000 bp) [22]. Ekspresja *DICER1* podlega dynamicznej regulacji poprzez mechanizmy wpływające na: transkrypcję genu, dojrzewanie mRNA i jego transport do cytoplazmy, translację i stabilność białka [23].

TRANSKRYPCJA *DICER1*

Transkrypcyjna kontrola ekspresji *DICER1* obejmuje: modyfikacje epigenetyczne, wybór alternatywnych miejsc promotorowych i sygnałów poliadenylacji, a także regulację przez czynniki działające w układzie *trans* [23]. Znanie są cztery warianty mRNA kodujące Dicer pełnej długości (1922 aa.) wyizolowane z szeregu zdrowych tkanek ludzkich [23]. Szczegółowe badania tych transkryptów wykazały, że różnią się one znacznie w obrębie rejonu 5' UTR.

Różnice te są skutkiem wyboru odmiennych miejsc startu transkrypcji oraz alternatywnego składania pre-mRNA. Ponieważ rejon 5' UTR zawiera sekwencje *cis*-regulatorowe, jego organizacja wpływa w istotny sposób na efektywność procesu translacji oraz tkankowo-specyficzny wzór ekspresji Dicer. Dodatkowo, w zróżnicowanych komórkach nabłonkowych oraz w szeregu linii komórek nowotworowych zidentyfikowano skrócone transkrypty *DICER1* powstające w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA [23]. Część z nich koduje polipeptydy obejmujące jedynie N- lub C-końcowy fragment Dicer, a niektóre z nich są transkryptami niekodującymi białko. Oprócz tego znane są cztery antysensowne transkrypty *DICER1* o długości od ~720 do ~2300 nt. Ich funkcja nie została jeszcze wyjaśniona. Niewykluczone, że pełnią one rolę regulatorową podobną do tej, jaką zaproponowano dla innych długich niekodujących RNA tego typu [24].

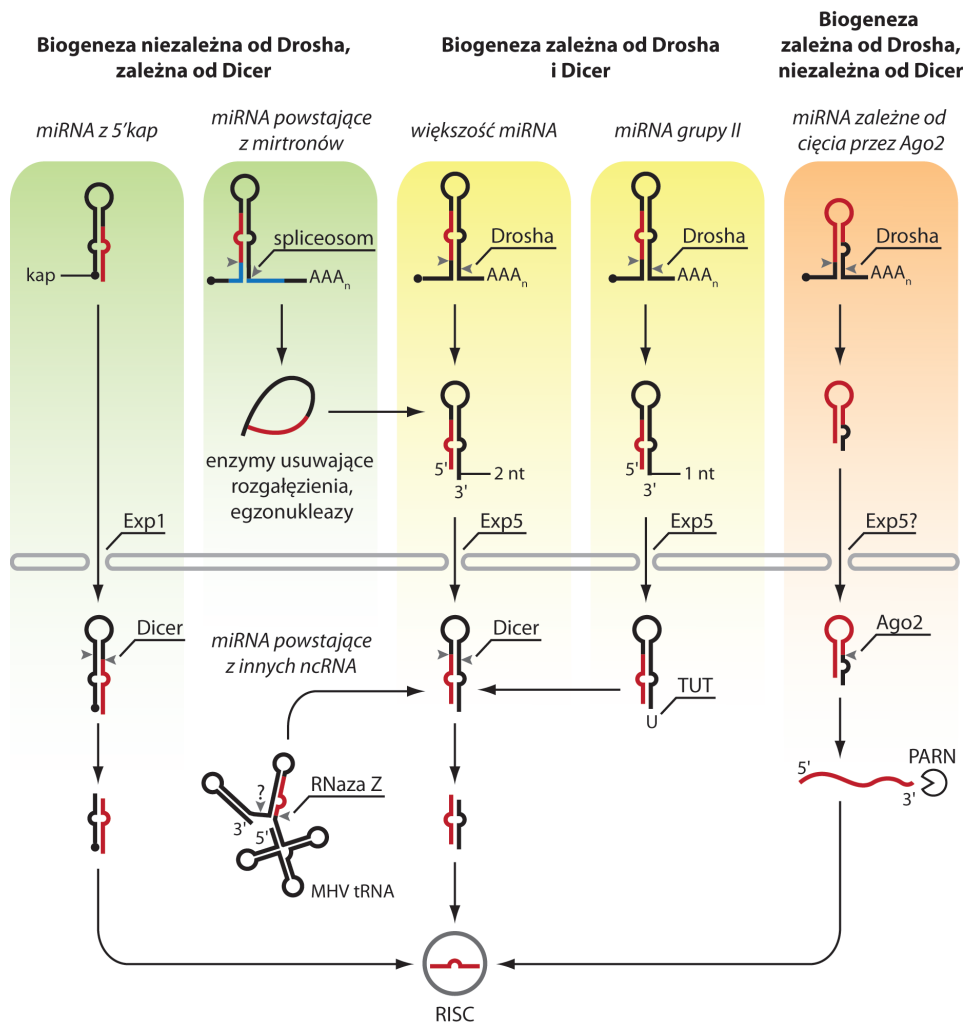
REGULACJA POTRANSKRYPCJA EKSPRESJI *DICER1*

Poziom mRNA *DICER1* nie koreluje z poziomem dojrzałego białka, co wskazuje na istotny udział mechanizmów potranskrypcyjnych w regulacji ekspresji tego genu [25]. Transport mRNA *DICER1* do cytoplazmy, przynajmniej częściowo, zależy od Eksportyny 5. Badania *in vitro* oraz immunoprecypitacja usieciowanych kompleksów RNA • białko potwierdziły bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy Eksportyną 5 i mRNA *DICER1*, a zahamowanie ekspresji genu kodującego ten transporter powoduje akumulację transkryptów *DICER1* w jądrze komórkowym [26].

Ekspresja *DICER1* może podlegać wyciszaniu indukowanemu przez srRNA generowane przez Dicer. W obrębie rejonu 3' UTR transkryptów *DICER1* oraz w części kodującej sekwencję białka zidentyfikowano miejsca oddziaływania dla szeregu miRNA, w tym m.in.: miR-103/107, miR-192 oraz miRNA z rodziny let-7 [23]. Co ciekawe, w wielu typach komórek nowotworowych znajdowane są transkrypty *DICER1* ze skróconym rejonem 3' UTR, pozbawionym części miejsc rozpoznawanych przez miRNA [27,28]. W efekcie, w komórkach posiadających takie skrócone transkrypty może dochodzić do wydajniejszej syntezy białka Dicer w porównaniu do komórek, w których występują transkrypty *DICER1* posiadające rejon 3' UTR pełnej długości [27].

MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE DICER

Modyfikacje potranslacyjne wpływają na właściwości fizyko-chemiczne białka, determinując jego stabilność i aktywność. W ludzkich i mysich liniach komórkowych oraz w *C. elegans* wykazano, że Dicer ulega fosforylacji, co hamuje aktywność enzymu i powoduje jego translokację do jądra komórkowego [29,30]. Co więcej, zależna od fosforylacji inhibicja Dicer jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu oogenezy u *C. elegans* [30]. Z kolei defosforylacja enzymu, zachodząca tuż przed zapłodnieniem oocyta, jest konieczna dla prawidłowego przebiegu embriogenezy [30]. Znaczenie fosforylacji w przypadku ludzkiej Dicer nie zostało w pełni wyjaśnione. Dicer może podlegać również sumoilacji, czyli kowalencyjnemu przyłączeniu białka SUMO, co zaobserwowano w ludzkich makrofagach pęcherzyków płucnych poddanych ekspozycji na dym tytoniowy. Wykazano, że



Rycina 3. Szlaki biogenezy miRNA u zwierząt

Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA obejmuje cięcie prekursorów przez Drosha i Dicer (większość miRNA). W przypadku pre-miRNA posiadających jednonukleotydy wystający koniec 3', przed cięciem przez Dicer dochodzi do 3' monourydylacji RNA przez UTP-transferazy (TUT), (miRNA grupy II). miRNA generowane niezależnie od Drosha powstają przy udziale Dicer z krótkich transkryptów Pol II (miRNA ze strukturą kap na końcu 5'), z mirtronów oraz innych ncRNA. Szlak niezależny od Dicer wymaga cięcia pre-miRNA przez Ago2 oraz egzonukleazę PARN. MHV tRNA - tRNA mysiego wirusa zapalenia wątroby; RISC - aktywny kompleks RISC.

modyfikacja ta zaburza aktywność enzymu i prowadzi do deregulacji poziomów miRNA [31]. Badania *in vitro* w ludzkich komórkach HEK293 wykazały również, że Dicer przechodzi przez siateczkę śródplazmatyczną, gdzie podlega N-glikozylacji [32]. Modyfikacja ta może mieć znaczenie dla prawidłowego fałdowania oraz stabilności białka.

Homeostaza komórki wymaga również funkcjonowania mechanizmów degradacji Dicer. Wykazano, że w komórkach ludzkich Dicer w stanie wolnym, tj., gdy nie wiąże RNA, podlega selektywnej makroautofagii. W proces ten zaangażowane jest białko NDP52 (ang. *nuclear dot 52 kDa protein*), które oddziałuje z cząsteczkami przeznaczonymi do degradacji oraz z receptorem Atg8 (ang. *autophagy-related protein 8*) obecnym w błonie pęcherzyka autofagosomalnego. Nie jest jednak jasne, jaki mechanizm prowadzi do makroautofagii Dicer [33], NDP52 może bowiem oddziaływać zarówno z białkami niemodyfikowanymi, jak również poddanymi ubikwitynacji (co jest częstym znacznikiem kierującym białka do proteasomu) [34]. Degradacja Dicer w sposób zależny od kompleksu ligazy ubikwityny CRL4 (ang.

cullin-ring finger ligase-4) została zaobserwowana w makrofagach w trakcie infekcji wirusem HIV-1 [35]. W proces ten zaangażowane jest wirusowe białko R, które oddziałuje z Dicer i rekrutuje kompleks modyfikujący rybonukleazę.

ROLA DICER W BIOGENEZIE miRNA

Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA obejmuje: transkrypcję przy udziale polimerazy II RNA (Pol II) [36] oraz następujące po sobie cięcia prekursorów przez dwie RNazy III: Drosha i Dicer (Ryc. 3). Powstające w jądrze pierwotne transkrypty miRNA (pri-miRNA, ang. *primary miRNA*) są rozpoznawane przez kompleks Mikroprocesora, w skład którego wchodzi rybonukleaza Drosha oraz białko DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*). Drosha wycina struktury typu spinki występujące w pri-miRNA, uwalniając ~60-nt pre-miRNA [37,38], które następnie transportowane są do cytoplazmy przez Eksportynę 5 i czynnik Ran w procesie zależnym od GTP [39, 40]. W cytoplazmie pre-miRNA podlega cięciu przez Dicer [41,42], a generowany dupleks miRNA/miRNA* o długości ~21 par zasad (pz) przekazywany jest do kompleksu efektorowego RNAi nazywanego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), gdzie jedna z nici (tzw.

nić pasażerska, miRNA*) jest usuwana, podczas gdy druga pozostaje związana z białkami kompleksu [43,44]. Niekiedy nić pasażerska nie podlega degradacji, ale również staje się funkcjonalnym miRNA pełniącym rolę regulatorową [45-48]. Ponadto, w przypadku niektórych pre-miRNA cząsteczką włączaną do RISC może być również fragment apikalny, który pozostaje po wycięciu dupletu miRNA/miRNA* [49,50]; miRNA tego typu nazwano loop-miRami (ang. *loop* - pętla).

Znane są także alternatywne ścieżki biogenezy miRNA [51]. Dotyczą one niewielkiej puli cząsteczek, obejmującej miRNA, których prekursorzy wymagają dodatkowej modyfikacji oraz miRNA powstające bez udziału Drosha lub Dicer (Ryc. 3). W przypadku miRNA, których prekursor generowany przez rybonukleazę Drosha posiada jednonukleotydy wystający koniec 3' (tzw. miRNA grupy II), po eksporcie pre-miRNA do cytoplazmy następuje dodatkowy etap 3' monourydylacji, który jest niezbędny dla utworzenia kanonicznego, dwunukleotydu końca 3' zapewniają-

cego stabilne oddziaływanie z Dicer. Reakcja ta w komórkach ludzkich katalizowana jest przez białka o aktywności UTP-transferazy: Zcchc6 (ang. *zinc finger, CCH domain containing 6*), Zcchc11 oraz PAPD4 (ang. *PAP associated domain containing 4*) nazywane też TUT7, TUT4, TUT2 (ang. *terminal uridylyltransferase 7/4/2*, odpowiednio). Dicer zaangażowana jest również w powstawanie miRNA z mirtronów, czyli krótkich intronów, uwalnianych z pre-mRNA przez kompleks splicingowy. W przypadku mirtronów, typowa dla intronów struktura *lassa* jest liniowana dzięki aktywności enzymów usuwających rozgałęzienia. Niekiedy też końce mirtronów są dodatkowo docinane przez egzonukleazy zanim cząsteczki te staną się substratami Dicer. Dicer generuje również miRNA z krótkich transkryptów przyjmujących strukturę typu spinki. Przykładem jest pre-mir-320, który powstaje w wyniku transkrypcji prowadzonej przez Pol II, następnie jest transportowany do cytoplazmy przez Eksportynę 1, by tam ulec cięciu przez Dicer. Mechanizmy biogenezy niezależnej od Drosha opisano również w przypadku miRNA lub cząsteczek typu miRNA uwalnianych przez Dicer z prekursorów powstających podczas dojrzewania lub degradacji: tRNA, małych jąderkowych RNA (snoRNAs, ang. *small nucleolar RNAs*) oraz pewnych wirusowych RNA. Co ciekawe, do tej pory zidentyfikowano tylko jeden przypadek miRNA (miR-451) powstającego bez udziału Dicer. Pre-mir-451 przyjmuje strukturę typu spinki, w której trzon ma długość jedynie ~18 pz i jest zbyt krótki, by ulec cięciu przez Dicer. Prekursor ten jest wiązany bezpośrednio przez białko Argonante 2 (AGO2) z kompleksu RISC. Ago2 przecina pre-mir-451 w obrębie ramienia 3' i generuje ~30-nt produkt pośredni, który jest następnie docinany przez rybonukleazę PARN (rybonukleazę specyficzną względem łańcucha poli(A), ang. *poly(A)-specific ribonuclease*), w efekcie czego powstaje funkcjonalny miR-451 o długości ~23 nt.

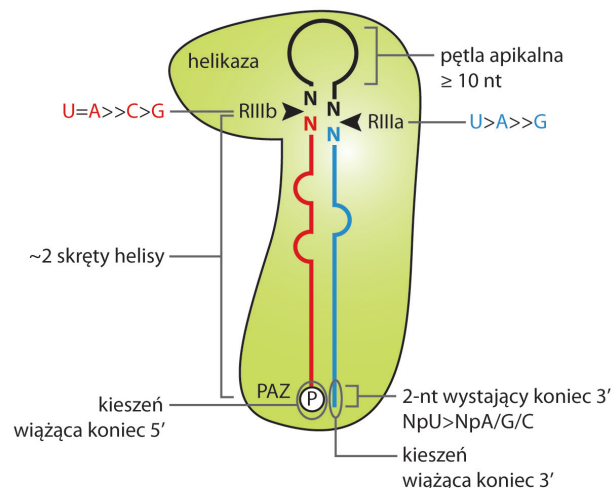
Rola Dicer w procesie RNAi nie kończy się na etapie wycięcia dupleksu miRNA/miRNA* z cząsteczek prekursorowych; Dicer uczestniczy również w przekazywaniu dupleksu do kompleksu białka AGO. Przyjmuje się, że transfer dwuniciowego produktu generowanego przez ludzką Dicer następuje w obrębie kompleksu ładującego RISC (RLC, ang. *RISC-loading complex*), w skład którego, oprócz Dicer, wchodzi również AGO i TRBP (ang. *HIV-1 transactivating response RNA binding protein*) [52]. Rekonstrukcja budowy RLC wykonana na podstawie wyników obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazała, że domena helikazowa Dicer zaangażowana jest w oddziaływanie z TRBP, podczas gdy centrum katalityczne enzymu znajduje się proksymalnie w stosunku do AGO [53]. Wyniki badań *in vitro* z wykorzystaniem dsRNA wskazują, że produkt generowany przez Dicer jest uwalniany z kompleksu Dicer•TRBP lub Dicer•PACT (ang. *protein activator of protein kinase R*), a następnie ponownie wiązany w odmiernej orientacji [54]. Według tego modelu, mniej stabilny termodynamicznie koniec dupleksu kotwiczony jest w obrębie domeny helikazowej Dicer, podczas gdy koniec bardziej stabilny wiązany jest przez białka wiążące dsRNA (dsRBP, ang. *dsRNA-binding protein*), tj. TRBP lub PACT. W kolejnym etapie następuje transfer dsRNA do AGO, najpierw części wiązanej przez dsRBP, a następnie końca oddziałującego z Dicer. Proces ten jest wspierany przez białka opiekuńcze: HSP70 i HSP90, które przeprowadzają hydrolizę ATP i

utrzymują AGO w konformacji otwartej, tj. faworyzującej przyjmowanie dsRNA [52]. Istnieją sprzeczne doniesienia na temat roli Dicer na dalszych etapach funkcjonowania RISC. Część z nich sugeruje, że Dicer, TRBP i AGO pozostają związane, a obecność Dicer i TRBP stymuluje aktywność AGO na etapie efektorowym RNAi [55]. Inne wyniki wskazują na dysocjację kompleksu po związaniu dsRNA przez AGO [56]

REGULACJA AKTYWNOŚCI ENDORYBONUKLEAZOWEJ DICER

Rozpatrując interakcje Dicer z pre-miRNA, należy wyraźnie rozgraniczyć dwa etapy: wiązanie i cięcie. Zarówno wyniki badań biochemicznych prowadzonych *in vitro* [57], jak i obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej [58] wskazują, że efektywność cięcia nie jest wprost zależna od powinowactwa enzymu do substratu. Na oba parametry wpływają: sekwencja i struktura drugorzędowa pre-miRNA oraz aktywność kofaktorów i innych czynników oddziałujących z RNA i/lub z Dicer. W porównaniu do jądrowego etapu dojrzewania miRNA, podczas którego funkcjonowanie Drosha jest stymulowane przez różnorodne białka, regulacja na etapie cytoplazmatycznym wydaje się polegać przede wszystkim na inhibicji aktywności Dicer.

Obecnie znanych jest ponad 1880 pre-miRNA zidentyfikowanych w komórkach ludzkich [miRBase v22, <http://www.mirbase.org/>]. Ogólny plan budowy pre-miRNA jest podobny: są to ~60-nt cząsteczki przyjmujące strukturę typu spinki zazwyczaj z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcu 3' (Ryc. 4). Przewidywane struktury drugorzędowe pre-miRNA różnią się jednak znacząco, co do natury końców, stabilności i długości dwuniciowego trzonu spinek, a także rozmiaru pętli apikalnej. Analiza porównawcza 161 ludzkich pre-miRNA wykazała, że cechy takie jak: dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3', obecność elementów rozluźniających strukturę dwuniciową w obrębie trzonu spinki i duża pętla apikalna (≥ 10 nt) znacząco podwyższają efektywność cięcia pre-miRNA przez Dicer, natomiast ich wpływ na tworzenie kompleksu enzym•sub-



Rycina 4. Schemat budowy kompleksu pre-miRNA i ludzkiej Dicer
Zaznaczono elementy pierwszo- i drugorzędowej struktury RNA, które są kluczowe dla oddziaływania substratu z enzymem oraz główne domeny Dicer odpowiedzialne za wiązanie i cięcie pre-miRNA.

strat jest dużo słabszy [57] (Ryc. 4). Wnioski te są spójne z wynikami innych badań wskazujących na to, że Dicer może wiązać RNA o zróżnicowanej strukturze drugorzędowej, natomiast jedynie cząsteczki posiadające specyficzne elementy strukturalne (Ryc. 4) są przez nią cięte [59,60].

Szereg białek wpływa na proces cięcia pre-miRNA przez Dicer poprzez oddziaływanie z prekursorami [61]. Efekty regulatorowe wywierane przez te białka wynikają między innymi ze zmiany sekwencji i struktury drugorzędowej RNA, rekrutacji lub wyparcia innych czynników regulatorowych i/lub enzymów, sekwestracji prekursorów. Zmiany sekwencji pre-miRNA obejmują edytowanie pre-miRNA oraz kowalencyjne modyfikacje końców: dimetylację grupy fosforanowej na końcu 5' oraz mono- lub poliurydylację końca 3'. Ponieważ ujemnie naładowana grupa monofosforanowa na końcu 5' pre-miRNA jest niezbędna dla zakotwiczenia substratu w dodatnio naładowanej kieszeni wiążącej RNA w obrębie domen Platformy i PAZ, metylacja, która prowadzi do neutralizacji ładunku ujemnego, zaburza wiązanie pre-miRNA przez Dicer. Z kolei modyfikacja końca 3' pre-miRNA przez terminalne transferazy urydylowe może mieć dwójaki skutek: monourydylacja pre-miRNA grupy II prowadzi do utworzenia kanonicznej struktury końca 3' prekursorów i zapewnia ich wydajne wiązanie przez Dicer, podczas gdy poliurydylacja pre-miRNA inicjowana przez Lin28A blokuje oddziaływanie z Dicer i przyczynia się do degradacji pre-miRNA przez egzonukleazy. Stosunkowo liczną grupę regulatorów biogenezy miRNA stanowią białka wiążące się do rejonu apikalnego pre-miRNA. Jak wspomniano wcześniej, oddziaływanie pomiędzy pętlą apikalną a domeną helikazową Dicer jest istotne dla przyjęcia przez rybonukleazę konformacji warunkującej wydajne wycinanie i uwalnianie miRNA. W związku z tym, zmiany struktury rejonu apikalnego pre-miRNA najprawdopodobniej wywierają efekt allosteryczny na aktywność Dicer.

Mimo że Dicer jest zdolna samodzielnie ciąć pre-miRNA *in vitro*, w warunkach komórkowych funkcjonuje ona w formie kompleksów białkowych, w których jej aktywność wspierana jest przez inne dsRBP. U człowieka podstawowymi partnerami Dicer są dwa strukturalnie podobne białka: TRBP i PACT [61-63]. Zarówno TRBP, jak i PACT posiadają trzy domeny dsRBD; jedna z nich (C-końcowa) jest zaangażowana w oddziaływanie z domeną helikazową Dicer, natomiast dwie pozostałe domeny wiążą RNA [16,62-65]. TRBP i PACT nie tylko rekrutują RNA do Dicer, ale także wpływają na strukturę rybonukleazy i jej substratu oraz dopasowanie RNA do centrum aktywnego enzymu. Wykazano, że PACT faworyzuje wiązanie i cięcie pre-miRNA [66]. Nie stwierdzono, by białko TRBP przyczyniało się do dyskryminacji pomiędzy prekursorami dla siRNA i miRNA [66], wykazano natomiast, że ułatwia ono selekcję pre-miRNA w środowisku, w którym występują inne RNA o strukturze typu spinki [67]. Ponadto oddziaływanie TRBP z Dicer wpływa na kinetykę reakcji katalizowanej przez enzym, zwiększając prędkość maksymalną ~4-5-krotnie [64]. Oddziaływanie z TRBP lub PACT może także wpływać na wzór cięcia pre-miRNA przez Dicer, przyczyniając się do powstawania izoform miRNA nieznacznie różniących się długością [13,66,68,69]. Dodatkowo, TRBP stabilizuje Dicer [55,70] oraz wspiera tworzenie kompleksu RISC i przeka-

zywanie dupleksu miRNA do białka AGO [13,53,55,62,71]. Podobne funkcje zaproponowano również dla PACT, choć jego rola w tym aspekcie funkcjonowania Dicer jest słabiej poznana [63,69].

Badania interaktomu ludzkiej Dicer doprowadziły do zidentyfikowania szeregu białek oddziałujących z nią bezpośrednio i wpływających na jej aktywność [23]. Białka te obejmują zarówno czynniki endogenne, jak i białka pochodzenia wirusowego. Wpływają one na zmiany struktury Dicer, uczestniczą w sekwestracji białka lub jego translokacji w obrębie komórki. W ostatnim czasie pojawiają się również doniesienia wskazujące na to, że nie tylko czynniki białkowe, ale również cząsteczki kwasów nukleinowych są zaangażowane w regulację aktywności Dicer [60,72,73]. W komórkach ludzkich oraz *C. elegans* w obrębie cząsteczek mRNA i lncRNA zidentyfikowano tzw. miejsca pasywnego wiązania Dicer [60]. Są to lokalne struktury typu spinki rozpoznawane przez Dicer, ale – ze względu na kontekst, w którym się znajdują (długie rejonu jednoniciowe oskrzydłające trzon spinki) – niecięte przez enzym. Postuluje się, że miejsca pasywne mogą kotwiczyć Dicer na transkryptach genów kodujących białka oddziałujące z rybonukleazą (np. TRBP) i w ten sposób ułatwiać tworzenie się funkcjonalnych kompleksów Dicer z syntetyzowanymi *in situ* białkami. Ponadto miejsca te mogą stanowić element regulacji aktywności Dicer poprzez sekwestrację rybonukleazy. Podobny mechanizm, oparty na współzawodniczeniu o wiązanie z Dicer, jest wykorzystywany przez wirusy [74,75]. W trakcie infekcji komórek ludzkich adenowirusem typu 5 produkowane są znaczne ilości wirusowego RNA działającego jak inhibitor kompetycyjny Dicer [74,75]. W wyniku wysycenia enzymu wirusowym RNA, dochodzi do deregulacji poziomu miRNA i osłabienia potencjału komórki do prawidłowej odpowiedzi odpornościowej.

FUNKCJE JĄDROWE DICER

Mimo że Dicer postrzegana jest przede wszystkim jako białko cytoplazmatyczne, jej obecność stwierdzono również w jądrze komórkowym, gdzie enzym ten zaangażowany jest w transkrypcyjną regulację ekspresji genów [76-79]. Wykazano np., że Dicer oddziałuje z receptorami jądrowymi i stymuluje transkrypcję przez Pol II szeregu genów posiadających w rejonach promotorowych sekwencje odpowiedzi na hormony steroidowe (ang. *steroid response elements*) [77]. W ostatnich latach pojawiają się również doniesienia o zaangażowaniu Dicer w ochronę stabilności genomu poprzez udział w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA Damage Response*) i naprawę dwuniciowych pęknięć DNA [80,81]. Ponadto Dicer zaangażowana jest w degradację potencjalnie niebezpiecznych transkryptów ruchomych elementów genetycznych [82] i dsRNA powstających jako produkty zbieżnej transkrypcji [83]. Akumulacja transkryptów powtórzeń *Alu*, do której dochodzi w wyniku mutacji zaburzających funkcjonowanie Dicer, jest cytotoksyczna i prowadzi do rozwoju zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem. Z kolei dsRNA powstające w wyniku zbieżnej transkrypcji, jeżeli nie zostaną zneutralizowane przez Dicer, po przedostaniu się do cytoplazmy uruchamiają odpowiedź interferonową, prowadząc do apoptozy komórki.

Podstawy molekularne transportu Dicer pomiędzy jądrem a cytoplazmą nie są w pełni poznane. Badania w liniach komórek HeLa wykazały, że domena dsRBD Dicer może funkcjonować jako atypowy sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localisation signal*) rozpoznawany przez importyny β [84]. W pełnej długości białku, NLS dsRBD jest najprawdopodobniej maskowany przez inne domeny lub nieznaną jeszcze czynnik białkowy. Wyniki badań w systemie heterokarionowym wykazały, że Dicer może przemieszczać się pomiędzy jądrem a cytoplazmą, co wskazuje na istnienie w obrębie białka również sygnału eksportu jądrowego [84]. Translokację Dicer do jądra stwierdzono także w następstwie odwracalnej fosforylacji w obrębie kasety PPC oraz domen RIII i dsRBD Dicer [30,81,85], o czym wspomniano już wcześniej.

UDZIAŁ DICER W PROCESIE APOPTOZY

Apoptoza jest naturalnym procesem zaprogramowanej śmierci komórki w organizmach wielokomórkowych [86]. Jej zadaniem jest doprowadzenie do usunięcia z organizmu starych lub uszkodzonych komórek. W wyniku ekspozycji komórek ssaków na silny stres lub szkodliwe czynniki następuje aktywacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które uruchamiają kaskadę wydarzeń zaburzających strukturę i funkcje metaboliczne komórki, prowadząc do jej śmierci. W zależności od czynnika indukującego, proces apoptozy może przebiegać z udziałem jednego z kilku szlaków, m.in. szlaku wewnętrznego, zależnego od mitochondriów, czy szlaku zewnętrznego, znanego jako receptorowy. Niezależnie od aktywowanego szlaku, w umierających komórkach dochodzi do fragmentacji chromosomalnego DNA w regionach internukleosomalnych. Inną charakterystyczną cechą apoptozy jest aktywacja w cytoplazmie proteaz cysteinowych, zwanych kaspazami, które odpowiadają za propagowanie sygnału (kaspazy indukujące, sygnałowe) oraz degradację białek komórkowych (kaspazy wykonawcze).

Obecnie wiadomo, że substratem kaspaz podczas procesu apoptozy staje się również rybonukleaza Dicer. Badania prowadzone w komórkach ludzkich hodowanych *in vitro* [87,88] i w komórkach *C. elegans* [7] wykazały, że Dicer podlega proteolitycznemu cięciu w wyniku którego dochodzi do akumulacji fragmentu białka nazwanego t-Dicer (ang. *truncated Dicer*), obejmującego część domeny RIIIa, domenę RIIIb oraz dsRBD. t-Dicer, ze względu na brak kompletnej domeny RIIIa, nie może tworzyć dimeru wewnątrzcząsteczkowego, w związku z czym nie posiada aktywności RNAzowej. Wykazano jednak, że w komórkach nicienia t-Dicer pełni funkcję deoksyrybonukleazy, która inicjuje degradację DNA, przyczyniając się do propagowania apoptozy [7]. Do tej pory brak jednak dowodów na to, że fragment uwalniany z ludzkiej Dicer może pełnić podobną rolę i również uczestniczyć we fragmentacji chromosomów.

POWIĄZANIE DICER Z PROCESAMI ZAPALNYMI

Pojawiające się w organizmie procesy zapalne powstają w wyniku reakcji obronnej komórek na czynniki zewnętrzne, patogeny i stres. Dzięki wspomnianym procesom organizm

jest w stanie bronić się i dążyć do ponownego przywrócenia równowagi oraz usunięcia szkodliwego czynnika. Jednym z enzymów zaangażowanych w biosyntezę przekazników zapalnych, umożliwiających uruchomienie procesów zapalnych w organizmie, jest 5-lipooksygenaza (5LO). U ludzi 5LO ulega ekspresji głównie w zróżnicowanych komórkach zapalnych, takich jak granulocyty, monocyty, makrofagi, komórki tuczne, komórki dendrytyczne i limfocyty B [89]. Enzym ten katalizuje pierwsze dwa etapy biosyntezy leukotrienów, które są silnymi mediatorami stanu zapalnego.

Wykazano, że 5LO wiąże się do fragmentu C-końcowego ludzkiej rybonukleazy Dicer, a oddziaływanie to wpływa na wzór cięcia pre-miRNA [8]. W kompleksie z 5LO Dicer generuje nietypowe produkty o długościach: ~10-12 nt i ~55 nt. Jak dotąd nie wyjaśniono funkcji tych RNA. Dowiedziono jednak, iż w wyniku oddziaływań Dicer z 5LO dochodzi do rearanżacji struktury enzymu; kluczowe dla generowania nietypowego wzoru cięcia pre-miRNA są najprawdopodobniej zmiany konformacyjne zachodzące w obrębie fragmentu C-końcowego Dicer.

Warto również wspomnieć, że dwadzieścia lat temu cDNA Dicer został wyizolowany z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego przy użyciu 5LO jako tzw. „przynęty” [90]. Dokładny charakter i wpływ oddziaływań Dicer-5LO pozostają niewyjaśnione, jednakże przytoczone dane dostarczają silnych dowodów na powiązanie Dicer z procesami zapalnymi.

AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZA DICER

Białka posiadające aktywność opiekuńczą, inaczej chaperony lub szaperony (ang. *chaperone*) wspierają proces fałdowania łańcuchów polipeptydowych (chaperony białek), bądź łańcuchów polinukleotydowych (chaperony kwasów nukleinowych) i przyjmowania przez te cząsteczki konformacji najkorzystniejszej energetycznie. Aktywność chaperonów białkowych ma istotne znaczenie dla prawidłowego zwijania się białek po translacji [91]. Chaperony kwasów nukleinowych mogą z kolei indukować zmiany konformacyjne w obrębie DNA bądź RNA, co w konsekwencji przekłada się na zmianę funkcji pełnionej przez daną cząsteczkę [92]. Dobrze znanym przykładem chaperonów kwasów nukleinowych są białka opiekuńcze kodowane przez wirusy. Białka te, poprzez wspieranie hybrydyzacji pomiędzy komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych, mogą decydować o zmianach w fazach cyklu wirusa, np. białko nukleokapsydu wirusa HIV indukuje proces replikacji wirusa [93].

W ostatnim czasie wykazano, że ludzka Dicer również może pełnić funkcje charakterystyczne dla chaperonów kwasów nukleinowych [20]. Wyniki badań *in vitro* przeprowadzone z wykorzystaniem pełnej długości białka oraz polipeptydów odpowiadających fragmentom Dicer wykazały, że najprawdopodobniej dzięki obecności domeny DUF283, Dicer wspiera parowanie sekwencji komplementarnych występujących w kwasach nukleinowych. Dowiedziono, że ludzka Dicer promuje hybrydyzację zarówno w pełni, jak i tylko częściowo komplementarnych nici RNA oraz DNA. Ponadto wykazano, że białko to wspomaga parowanie po-

między krótkim RNA a fragmentem do niego komplementarnym, występującym w dłuższym RNA o złożonej strukturze drugo- i trzeciorzędowej. W zastosowanym modelu badawczym sekwencja komplementarna wobec krótkiego RNA występowała w trzonie spinki tworzonej przez dłuższą cząsteczkę, zatem struktura drugorzędowa dłuższej nici musiała zostać rozluźniona, by udostępnić sekwencję komplementarną do hybrydyzacji z krótszym RNA [20]. Zgromadzone dane sugerują zatem, że ludzka Dicer może rozluźniać („topić”) złożone struktury drugo- i trzeciorzędowe obecne w RNA. Podejrzewa się, że aktywność chaperonowa Dicer może odgrywać rolę podczas wiązania cząsteczek pre-miRNA; zmiany konformacyjne zachodzące w obrębie pre-miRNA mogą mieć duży wpływ na efektywność cięcia substratu przez Dicer. Zaproponowano, że Dicer może również wspierać parowanie cząsteczek miRNA lub siRNA z komplementarnymi sekwencjami regulatorowymi w rejonach 3' UTR transkryptów i w ten sposób wspomagać lub konkurować z białkami AGO na etapie efektorowym RNAi [20].

PODSUMOWANIE

Udział w procesie biogenezy srRNA jest najlepiej poznaną rolą rybonukleazy Dicer, postrzeganą jako kanoniczna funkcja tego enzymu. Biorąc pod uwagę złożoność budowy Dicer oraz jej zdolność do oddziaływania z cząsteczkami kwasów nukleinowych o bardzo różnicowanej długości i strukturze, nie powinny dziwić pojawiające się w ostatnich latach doniesienia dotyczące tzw. niekanonicznych funkcji Dicer. Przykładem takich funkcji są, m.in., udział Dicer w metabolizmie różnorodnych cząsteczek RNA, ochronie integralności genomu, a także w procesie apoptozy, czy w procesach zapalnych. Aktualne rozumienie aktywności Dicer niezwiązanych z powstawaniem miRNA oraz siRNA jest wciąż ograniczone. Nie ulega jednak wątpliwości, że znaczenie Dicer dla prawidłowego funkcjonowania komórek wykracza daleko poza biogenezę srRNA.

PIŚMIENNICTWO

- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366
- Nicholson AW (2014) Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 5: 31-48
- Macrae IJ, Li F, Zhou K, Cande WZ, Doudna JA (2006) Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 73-80
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118: 57-68
- Cerutti H, Casas-Mollano JA (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50: 81-99
- Provost P, Dishart D, Doucet J, Frenthewey D, Samuelsson B, Radmark O (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 21: 5864-5874
- Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D (2010) Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science* 328: 327-334
- Dincbas-Renqvist V, Pepin G, Rakonjac M, Plante I, Ouellet DL, Hermansson A, Goulet I, Doucet J, Samuelsson B, Radmark O, Provost P (2009) Human Dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain. *Biochim Biophys Acta* 1789: 99-108

- Sheng P, Fields C, Aadland K, Wei T, Kolaczowski O, Gu T, Kolaczowski B, Xie M (2018) Dicer cleaves 5'-extended microRNA precursors originating from RNA polymerase II transcription start sites. *Nucleic Acids Res* 46: 5737-5752
- Liu Z, Wang J, Cheng H, Ke X, Sun L, Zhang QC, Wang HW (2018) Cryo-EM structure of human dicer and its complexes with a pre-miRNA Substrate. *Cell* 173: 1191-1203.e1112
- Takeshita D, Zenno S, Lee WC, Nagata K, Saigo K, Tanokura M (2007) Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer. *J Mol Biol* 374: 106-120
- Tian Y, Simanshu DK, Ma JB, Park JE, Heo I, Kim VN, Patel DJ (2014) A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human dicer. *Mol Cell* 53: 606-616
- Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA (2014) Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell* 57: 397-407
- Ma E, Zhou K, Kidwell MA, Doudna JA (2012) Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing. *J Mol Biol* 422: 466-476
- Bennasser Y, Jeang KT (2006) HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology* 3: 95
- Daniels SM, Melendez-Pena CE, Scarborough RJ, Daher A, Christensen HS, El Far M, Purcell DF, Laine S, Gatignol A (2009) Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Mol Biol* 10: 38
- Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA (2008) Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol* 380: 237-243
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: 195-198
- Mickiewicz A, Sarzynska J, Milostan M, Kurzynska-Kokorniak A, Rybarczyk A, Lukasiak P, Kulinski T, Figlerowicz M, Blazewicz J (2017) Modeling of the catalytic core of *Arabidopsis thaliana* Dicer-like 4 protein and its complex with double-stranded RNA. *Comput Biol Chem* 66: 44-56
- Kurzynska-Kokorniak A, Pokornowska M, Koralewska N, Hoffmann W, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M (2016) Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain *in vitro*. *Sci Rep* 6: 23989
- Ota H, Sakurai M, Gupta R, Valente L, Wulff BE, Ariyoshi K, Iizasa H, Davuluri RV, Nishikura K (2013) ADAR1 forms a complex with dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing. *Cell* 153: 575-589
- Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Bicchato S, Piccolo S (2010) A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141: 1195-1207
- Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, Figlerowicz M (2015) The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res* 43: 4365-4380
- Pelechano V, Steinmetz LM (2013) Gene regulation by antisense transcription. *Nat Rev Genet* 14: 880-893
- Wiesen JL, Tomasi TB (2009) Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* 46: 1222-1228
- Bennasser Y, Chable-Bessia C, Triboulet R, Gibbings D, Gwizdek C, Dargemont C, Kremer EJ, Voinnet O, Benkirane M (2011) Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nat Struct Mol Biol* 18: 323-327
- Mayr C, Bartel DP (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138: 673-684
- Hamaya Y, Kuriyama S, Takai T, Yoshida K, Yamada T, Sugimoto M, Osawa S, Sugimoto K, Miyajima H, Kanaoka S (2012) A distinct expression pattern of the long 3'-untranslated region dicer mRNA and its implications for posttranscriptional regulation in colorectal cancer. *Clin Transl Gastroenterol* 3: e17

29. Rigbolt KT, Prokhorova TA, Akimov V, Henningsen J, Johansen PT, Kratchmarova I, Kassem M, Mann M, Olsen JV, Blagoev B (2011) System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal* 4: rs3
30. Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, Ladbury JE, Fire AZ, Skeath JB, Arur S (2014) A requirement for ERK-dependent dicer phosphorylation in coordinating oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev Cell* 31: 614-628
31. Gross TJ, Powers LS, Boudreau RL, Brink B, Reisetter A, Goel K, Gerke AK, Hassan IH, Monick MM (2014) A microRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to SUMOylation of the endonuclease DICER. *J Biol Chem* 289: 12823-12834
32. Pepin G, Perron MP, Provost P (2012) Regulation of human Dicer by the resident ER membrane protein CLIMP-63. *Nucleic Acids Res* 40: 11603-11617
33. Gibbings D, Mostowy S, Jay F, Schwab Y, Cossart P, Voignet O (2012) Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol* 14: 1314-1321
34. von Muhlinen N, Thurston T, Ryzhakov G, Bloor S, Randow F (2010) NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy* 6: 288-289
35. Casey Klockow L, Sharifi HJ, Wen X, Flagg M, Furuya AK, Nekorchuk M, de Noronha CM (2013) The HIV-1 protein Vpr targets the endonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology* 444: 191-202
36. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060
37. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670
38. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419
39. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98
40. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016
41. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34
42. Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060
43. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y (2009) Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 16: 953-960
44. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, Tomari Y ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17: 17-23
45. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, Just A, Remke J, Zimmer K, Zeug A, Ponimaskin E, Schmiedl A, Yin X, Mayr M, Halder R, Fischer A, Engelhardt S, Wei Y, Schober A, Fiedler J, Thum T (2014) Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 124: 2136-2146
46. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 15: 354-363
47. Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* 17: 312-326
48. Yang X, Du WW, Li H, Liu F, Khorshidi A, Rutnam ZJ, Yang BB (2013) Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res* 41: 9688-9704
49. Winter J, Link S, Witzigmann D, Hildenbrand C, Previti C, Diederichs S (2013) Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions. *Nucleic Acids Res* 41: 5503-5512
50. Okamura K, Ladewig E, Zhou L, Lai EC (2013) Functional small RNAs are generated from select miRNA hairpin loops in flies and mammals. *Genes Dev* 27: 778-792
51. Yang JS, Lai EC (2011) Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell* 43: 892-903
52. Nakanishi K (2016) Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7: 637-660
53. Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E (2009) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1148-1153
54. Noland CL, Ma E, Doudna JA (2011) siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Mol Cell* 43: 110-121
55. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744
56. Maniataki E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19: 2979-2990
57. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng Y (2012) A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA* 18: 2083-2092
58. Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA, Wang HW (2013) Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 20: 662-670
59. Liu Z, Wang J, Li G, Wang HW (2014) Structure of precursor microRNA's terminal loop regulates human Dicer's dicing activity by switching DExH/D domain. *Protein Cell* 6: 185-193
60. Rybak-Wolf A, Jens M, Murakawa Y, Herzog M, Landthaler M, Rajewsky N (2014) A Variety of Dicer Substrates in Human and *C. elegans*. *Cell* 159: 1153-1167
61. Michlewski G, Caceres JF (2019) Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA* 25: 1-16
62. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6: 961-967
63. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25: 522-532
64. Chakravarthy S, Sternberg SH, Kellenberger CA, Doudna JA (2010) Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J Mol Biol* 404: 392-402
65. Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA (2013) Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res*
66. Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA (2013) Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res* 41: 6568-6576
67. Fareh M, Yeom KH, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C (2016) TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun* 7: 13694
68. Fukunaga R, Han BW, Hung JH, Xu J, Weng Z, Zamore PD (2012) Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* 151: 533-546
69. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA (2015) Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell* 57: 397-407
70. Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q (2009) Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139: 112-122

71. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008) *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 512-517
72. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M (2013) A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer. *PLoS One* 8: e77703
73. Koralewska N, Hoffmann W, Pokornowska M, Milewski M, Lipinska A, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M, Kurzynska-Kokorniak A (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* 63: 773-783
74. Lu S, Cullen BR (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol* 78: 12868-12876
75. Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79: 9556-9565
76. Gagnon KT, Li L, Chu Y, Janowski BA, Corey DR (2014) RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep* 6: 211-221
77. Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, Foulds CE, Stuart LM, Barker A, Russell VJ, Ramsay K, Kobelke SJ, Hatchell EC, Payne C, Giles KM, Messineo A, Gatignol A, Lanz RB, O'Malley BW, Leedman PJ (2013) RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 6536-6541
78. Sinkkonen L, Hugen Schmidt T, Filipowicz W, Svoboda P (2010) Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells. *PLoS One* 5: e12175
79. Tan Y, Zhang B, Wu T, Skogerbo G, Zhu X, Guo X, He S, Chen R (2009) Transcriptional inhibitor of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC Mol Biol* 10: 12
80. Tang KF, Ren H (2012) The role of dicer in DNA damage repair. *Int J Mol Sci* 13: 16769-16778
81. Burger K, Schlackow M, Potts M, Hester S, Mohammed S, Gullerova M (2017) Nuclear phosphorylated Dicer processes double-stranded RNA in response to DNA damage. *J Cell Biol* 216: 2373-2389
82. Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, Kleinman ME, Ponicsan SL, Hauswirth WW, Chiodo VA, Kariko K, Yoo JW, Lee DK, Hadziahmetovic M, Song Y, Misra S, Chaudhuri G, Bu-aas FW, Braun RE, Hinton DR, Zhang Q, Grossniklaus HE, Provis JM, Madigan MC, Milam AH, Justice NL, Albuquerque RJ, Blandford AD, Bogdanovich S, Hirano Y, Witta J, Fuchs E, Littman DR, Ambati BK, Rudin CM, Chong MM, Provost P, Kugel JF, Goodrich JA, Dunaief JL, Baffi JZ, Ambati J (2011) DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 471: 325-330
83. White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M (2014) Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* 21: 552-559
84. Doyle M, Badertscher L, Jaskiewicz L, Guttinger S, Jurado S, Hugen-schmidt T, Kutay U, Filipowicz W (2013) The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal. *RNA* 19: 1238-1252
85. Arur S, Ohmachi M, Nayak S, Hayes M, Miranda A, Hay A, Golden A, Schedl T (2009) Multiple ERK substrates execute single biological processes in *Caenorhabditis elegans* germ-line development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4776-4781
86. Nagata S (2018) Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu Rev Immunol* 36: 489-517
87. Matskevich AA, Moelling K (2008) Stimuli-dependent cleavage of Dicer during apoptosis. *Biochem J* 412: 527-534
88. Ghodgaonkar MM, Shah RG, Kandan-Kulangara F, Affar EB, Qi HH, Wiemer E, Shah GM (2009) Abrogation of DNA vector-based RNAi during apoptosis in mammalian cells due to caspase-mediated cleavage and inactivation of Dicer-1. *Cell Death Differ* 16: 858-868
89. Radmark O, Wertz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2007) 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 32: 332-341
90. Provost P, Samuelsson B, Radmark O (1999) Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1881-1885
91. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 82: 323-355
92. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2011) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 82: 323-355
93. Dirac AM, Huthoff H, Kjems J, Berkhout B (2002) Regulated HIV-2 RNA dimerization by means of alternative RNA conformations. *Nucleic Acids Res* 30: 2647-2655
94. Liu Z, Wang J, Cheng H, Ke X, Sun L, Zhang QC, Wang HW (2018) Cryo-EM structure of human Dicer and its complexes with a pre-miRNA substrate. *Cell* 174: 30452-30455

Human ribonuclease Dicer - structure and functions

Natalia Koralewska¹, Kinga Ciechanowska¹, Maria Pokornowska¹, Marek Figlerowicz^{1,2}, Anna Kurzynska-Kokorniak¹✉

¹Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

²Institute of Computing Science, Poznan University of Technology, Poznan, Poland

✉corresponding author: akurzyns@ibch.poznan.pl

Key words: ribonuclease Dicer, regulatory RNAs, miRNA biogenesis, nucleic acids chaperones

SUMMARY

Endoribonuclease III Dicer plays a crucial role in the biogenesis of small regulatory RNAs, such as microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs). However, this is not the only role that Dicer plays in cells. For example, it has been shown that Dicer is involved in processing of diverse classes of RNA, including tRNA and snoRNA, cleavage of repeat-element-derived RNAs, and maintenance of genome integrity. Dicer has also been found to participate in the chromosome fragmentation during apoptosis or in the inflammatory processes. Moreover, a recent discovery of Dicer-binding passive sites in mRNAs and long non-coding RNAs, and its putative nucleic acid chaperone activity, has pointed out a novel regulatory role of the enzyme. Here we focus on human Dicer and review its structure and function including recent findings on miRNA-independent roles and their impact on cell biology.