

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Zakład Ekspresji Genów

Laboratorium Dojrzewiania RNA

Marlena Cichocka

**Nowe funkcje białka hnRNP UL1 w komórkach
ludzkich**



Rozprawa doktorska

Praca napisana pod kierunkiem

Prof. UAM dr hab. Katarzyny Doroty

Raczyńskiej

Pragnę bardzo serdecznie podziękować mojej promotorce Prof. UAM dr hab. Katarzynie Dorocie Raczyńskiej, za nieocenioną pomoc, wsparcie i cierpliwość przy pisaniu niniejszej pracy oraz podczas pracy eksperymentalnej wykonywanej w laboratorium.

Dziękuję również dr Patrycji Plewce, dr Agacie Stępień oraz mgr Kishorowi Gawade za pomoc i merytoryczne wsparcie przy eksperymentach oraz analizie danych.

Moim drogim rodzicom oraz bratu, dziękuję za mobilizację i miłość, która pomogła przetrwać trudne chwile.

Drogiej koleżance Annie Kozłowskiej, dziękuję za wiarę we mnie i niesamowite mentalne wsparcie.

Wszystkim pracownikom oraz doktorantom Zakładu Ekspresji Genów za miłą atmosferę, wsparcie oraz wspomnienia.

Finansowanie

- Grant NCN PRELUDIUM, nr UMO-2020/37/N/NZ1/0185, pt. „Funkcja U7 snRNA, FUS i hnRNP UL1 w jąderku komórek ludzkich w powiązaniu z chorobą ALS”. Kierownik Marlena Cichocka.
- Grant NCN OPUS, nr UMO-2015/19/B/NZ1/00233, pt. „Diverse functions of U7 snRNP during the cell cycle”. Kierownik prof. UAM, dr hab. Katarzyna Dorota Raczyńska.
- Grant Dziekana Wydziału Biologii UAM, GDWB-09/2018, 01.10.2018-2019, pt. „Wyciszenie białka UL1 hnRNP w komórkach HEK 293T przy użyciu techniki CRISPR-Cas9 oraz analiza wpływu braku tego białka na przebieg cyklu komórkowego”. Kierownik Marlena Cichocka.
- Stypendium dla Doktoranta - Projekt rozprawy doktorskiej realizowanej w ramach międzynarodowego programu doktoranckiego KNOW "Poznańskie Konsorcjum RNA" w latach 2015-2018. Stypendysta Marlena Cichocka.
- Stypendium dla Doktoranta - "Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie na Wydziale Biologii UAM, POWER.03.02.00-00-I006/17" w latach 2018-2022. Stypendysta Marlena Cichocka.
- Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów w latach 2019-2020. Stypendysta Marlena Cichocka.

Publikacje

Wyniki badań niniejszej rozprawy doktorskiej z części opisującej rolę białka hnRNP UL1 w jąderkach komórek ludzkich przedstawiono w publikacji:

- Cichocka M., Karlik A., Plewka P., Gawade K., Stępień A., Świergiel P., Gadgil A., Raczyńska KD., The Novel Role of hnRNP UL1 in Human Cell Nucleoli, *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(13): 4809-4823. doi: 10.7150/ijbs.75084.

W trakcie realizacji rozprawy doktorskiej opublikowano również poniższe publikacje:

- Cichocka M., Raczynska KD., Regulowana ekspresja genów histonowych z udziałem U7 snRNP, *Na pograniczu chemii i biologii*, 2019, 38:131-154.
- Brzek A., Cichocka M., Dolata J., Juzwa W., Schümperli D., Raczynska KD., Positive cofactor 4 (PC4) contributes to the regulation of replication-dependent canonical histone gene expression, *BMC Molecular Biology*, 2018, 19(9):1.

Spis treści

1. Wstęp.....	8
1.1. Białko hnRNP UL1 (ang. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1</i>).....	8
1.2. Jąderko komórkowe – budowa i funkcja.....	8
1.3. Naprawa uszkodzeń rDNA.....	12
1.3.1 Reorganizacja jąderka i tworzenie czapeczek jąderkowych.....	13
1.3.2 NHEJ.....	15
1.3.3 HR.....	15
1.3.4 Naprawa uszkodzeń jednoniciowych rDNA.....	18
1.4. Rola hnRNP UL1 w naprawie uszkodzeń DNA.....	18
1.5. Wzajemne interakcje hnRNP UL1, FUS i U7 snRNA.....	19
2. Cel pracy.....	22
3. Materiały.....	23
3.1. Ludzkie linie komórkowe HEK 293T i HeLa.....	23
3.2. Szczep bakterii.....	23
3.3. Enzymy, bufory i odczynniki.....	23
3.4. Startery.....	27
3.5. Wektory genetyczne.....	32
3.6. Konstrukty genetyczne do ekspresji białek hnRNP UL1 i FUS.....	34
3.7. Przeciwciała.....	35
3.8. Zestawy gotowych odczynników i ich zastosowanie.....	36
3.9. Mikroskopy.....	37
4. Metody.....	37
4.1. Techniki pracy z komórkami ludzkimi typu adherentnego.....	37
4.1.1. Rozmrożenie linii komórkowych.....	37
4.1.2. Pasaż i hodowla komórek.....	38
4.1.3. Zamrażanie komórek.....	39
4.1.4. Wyprowadzenie linii komórkowej z wyciszeniem genu <i>HNRNPUL1</i>	39
4.1.5. Wyprowadzenie linii komórkowej ze stabilną nadekspresją białka hnRNP UL1.....	42
4.1.6. Transfekcja przejściowa komórek ludzkich.....	44
4.1.7. Synchronizacja komórek.....	45
4.1.8. Izolacja jąderek.....	46

4.1.9. Indukcja uszkodzeń DNA w komórkach ludzkich.....	47
4.2. Techniki pracy z komórkami bakteryjnymi <i>Escherichia coli</i>	47
4.2.1. Transformacja metodą szoku cieplnego (ang. <i>heat shock</i>) komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	47
4.2.2. Posiew kultury bakterii na pożywkę stałą i płynną LB.....	48
4.2.3. Izolacja plazmidów.....	48
4.2.4. PCR kolonijny.....	48
4.3. Techniki pracy z RNA.....	49
4.3.1. Izolacja RNA.....	49
4.3.2. Elektroforeza RNA.....	49
4.3.3. Synteza cDNA.....	50
4.3.4. qPCR (ang. <i>quantitative PCR</i>).....	50
4.3.5. RNA-seq.....	51
4.3.6. Northern blot.....	51
4.4. Techniki pracy z DNA.....	52
4.4.1. Izolacja DNA genomowego (gDNA).....	52
4.4.2. PCR.....	52
4.4.3. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	53
4.4.4. Elucja DNA z żelu agarozowego.....	53
4.4.5. Trawienie restrykcyjne.....	53
4.4.6. Defosforylacja końców 5'.....	53
4.4.7. Reakcja ligacji.....	54
4.5. Techniki pracy z białkami.....	54
4.5.1. Ekstrakcja białek.....	54
4.5.2. Kolorymetryczny pomiar stężenia białek.....	54
4.5.3. Immunoprecypitacja.....	55
4.5.4. Strącenie białek za pomocą kwasu trichlorooctowego-TCA.....	56
4.5.5. Immunoprecypitacja chromatyny-ChIP.....	56
4.5.6. Western blot połączony z immunodetekcją.....	58
4.5.7. Spektrometria mas.....	60
4.5.8. Phos-taq.....	60
4.5.9. Profilowanie polisomów.....	60
4.6. Techniki mikroskopowe.....	61
4.6.1. FISH połączony z immunofluorescencją.....	61

4.6.2.	Barwienie immunologiczne.....	62
4.6.3.	PLA.....	63
5.	Wyniki.....	65
5.1.	Rola hnRNP UL1 w jąderkach komórek ludzkich.....	65
5.1.1.	Wprowadzenie linii typu knockout z wyciszeniem genu <i>HNRNPUL1</i> w komórkach HEK 293T.....	65
5.1.2.	Wpływ hnRNP UL1 na poziom rRNA i białka rybosomowe.....	68
5.1.3.	Wpływ hnRNP UL1 na regulację transkrypcji genów rRNA.....	72
5.1.4.	Rola hnRNP UL1 w naprawie uszkodzeń DNA.....	76
5.2.	Rola hnRNP UL1, U7 snRNP i FUS w regulacji ekspresji genów histonowych.....	85
5.2.1.	Analiza poziomu hnRNP UL1 w fazach cyklu komórkowego.....	85
5.2.2.	Analiza poziomu białka FUS i U7 snRNA w liniach HEK UL1 KO oraz poziomu białka hnRNP UL1 w liniach HeLa FUS KO.....	87
5.2.3.	Analiza wzajemnych oddziaływań FUS i hnRNP UL1.....	88
5.2.4.	Badanie poziomu modyfikacji potranslacyjnych białka hnRNP UL1 i ich wpływu na oddziaływanie z białkiem FUS.....	89
5.2.5.	Analiza interakcji FUS i hnRNP UL1 z U7 snRNA w liniach HeLa FUS KO i HEK UL1 KO.....	91
5.2.6.	Analiza ekspresji genów histonów zależnych od replikacji.....	92
6.	Dyskusja.....	95
6.1.	Funkcje białka hnRNP UL1 w jąderkach komórek ludzkich.....	95
6.2.	Rola białka hnRNP UL1 w inhibicji ekspresji genów histonowych.....	98
7.	Podsumowanie.....	101
8.	Literatura.....	102

Streszczenie

Białko hnRNP UL1 jest zaangażowane w proces transkrypcji, działając głównie jako negatywny regulator hamujący ekspresję określonych genów. Ponadto, białko hnRNP UL1 uczestniczy w procesie splicingu oraz w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA. Dodatkowo, wyniki naszej grupy badawczej pokazały po raz pierwszy, że hnRNP UL1 przemieszcza się również do jąder komórek ludzkich. Poznanie funkcji, jakie białko to pełni w jąderkach komórkowych, stanowiło główny temat niniejszej rozprawy doktorskiej. Ponadto, podjęłam również próbę opisu wzajemnych interakcji pomiędzy hnRNP UL1, FUS i U7 snRNP, oraz określenia roli białka hnRNP UL1 w inhibicji genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego, którą pełni wraz z białkiem FUS i cząstką U7 snRNP.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazałam, że białko hnRNP UL1 w jąderku komórek ludzkich stymuluje transkrypcję genów rRNA, ale nie jest zaangażowane w kolejne etapy biogenezy rybosomów. Dalsze eksperymenty z wykorzystaniem odczynników genotoksycznych CPT i ETO wskazały, że komórki z wyciszeniem białka hnRNP UL1 są wrażliwsze na uszkodzenia DNA. Ponadto, pokazałam, że hnRNP UL1 oddziałuje z białkami szlaków naprawy uszkodzeń rDNA, takimi jak γ H2A.X, RPA32, XRCC1 i Chk1, potwierdzając jego udział w tych procesach.

Wyniki kolejnych eksperymentów pokazały, że białko hnRNP UL1 oddziałuje z białkiem FUS najsilniej poza fazą S cyklu komórkowego. Co ciekawe, zarówno FUS jak i hnRNP UL1 silniej wiążą U7 snRNA przy braku drugiego białka, wskazując, że oba białka mogą konkurować o dostępność do U7 snRNA. Zauważyłam również, że poziom fosforylacji białka hnRNP UL1 zmienia się w fazach cyklu komórkowego, co sugeruje, że to właśnie ta modyfikacja może regulować zmiennym oddziaływaniem hnRNP UL1 z białkiem FUS; takiej roli nie ogrywają natomiast metylacje argininy. Wykazałam ponadto, że hnRNP UL1 nie pełni roli inhibitora ekspresji genów histonowych w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego, wydaje się jednak być inhibitorem ekspresji tych genów w fazie S.

Abstract

The hnRNP UL1 protein is involved in transcription, acting mainly as a negative regulator that inhibits the expression of specific genes. Furthermore, hnRNP UL1 is involved in splicing and the cell response to DNA damage. In addition, the results of our research group showed for the first time that hnRNP UL1 also moves into the nucleoli of human cells. Learning more about the functions of hnRNPUL1 in cell nucleoli was the main topic of this dissertation. In addition, I also attempted to describe the interactions between hnRNP UL1, FUS, and U7 snRNP, and to determine the role of the hnRNP UL1 protein in the inhibition of histone genes outside the S phase of the cell cycle, which it performs together with the FUS protein and U7 snRNP.

Based on my experiments, I showed that the hnRNP UL1 protein stimulates the transcription of rRNA genes in the nucleolus of human cells, however, it is not involved in the subsequent steps of ribosome biogenesis. Further experiments using genotoxic reagents CPT and ETO indicated that cells with silencing of the hnRNP UL1 protein are more sensitive to DNA damage. In addition, I showed that hnRNP UL1 interacts with proteins of the rDNA damage repair pathways such as γ H2A.X, RPA32, XRCC1, and Chk1, confirming its involvement in these processes.

The results of subsequent experiments showed that the hnRNP UL1 protein interacts with the FUS protein the highest outside the S phase of the cell cycle. Interestingly, both FUS and hnRNP UL1 bind U7 snRNA more strongly in the absence of the other protein, indicating that the two proteins can compete for accessibility to U7 snRNA. I also observed that the phosphorylation level of the hnRNP UL1 protein changes during phases of the cell cycle, suggesting that this modification may regulate the variable interaction of hnRNP UL1 with the FUS protein; such a role is not played by arginine methylations. I further demonstrated that hnRNP UL1 does not play a role as an inhibitor of histone gene expression in the G1 and G2 phases of the cell cycle but appears to be an inhibitor of the expression of these genes in the S phase.

1. Wstęp

1.1. Białko hnRNP UL1 (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1*)

Białko hnRNP UL1, znane również jako E1B-AP5 (ang. *adenovirus early region 1B-associated protein 5*), jest zaangażowane w proces transkrypcji, działając głównie jako negatywny regulator hamujący ekspresję określonych genów. hnRNP UL1 odgrywa również rolę w splicingu, poprzez bezpośrednie wiązanie się z DNA i/lub RNA lub poprzez interakcję z innymi białkami spliceosomu (Blackwell i in., 2022; Gabler i in., 1998). Ponadto, białko hnRNP UL1 jest również zaangażowane w odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA.

Co ciekawe, grupa badawcza Laboratorium Dojrzewania RNA zaobserwowała lokalizację białka hnRNP UL1 w jąderku komórkowym komórek ludzkich. Jąderkowa lokalizacja hnRNP UL1 nie została wcześniej odnotowana. Dlatego, funkcja białka hnRNP UL1 w jąderku komórkowym nie jest znana i stanowi główny temat niniejszej rozprawy doktorskiej.

1.2. Jąderko komórkowe – budowa i funkcja

Jąderko jest dynamiczną częścią jądra modulowaną przez stres, nowotwory, infekcje wirusowe, zdarzenia sygnalizacyjne i zmiany w fizjologii komórki (Grummt, 2013). Jąderko komórkowe jest zorganizowane wokół wielu kopii genów rybosomowego RNA (rRNA), które tworzą heterochromatynę okołojąderkową PH (ang. *peri-nucleolar heterochromatin*), w fibrylarnych częściach jąderka (Fig. 1). Heterochromatyna odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu jąderka poprzez zapobieganie rekombinacji homologicznej między powtórzeniami rDNA, co stabilizuje rDNA i pozwala zachować strukturę jąderka. Utrata wyciszenia koreluje z niestabilnością rDNA, rozpadem jąderek i starzeniem komórkowym, podkreślając znaczenie heterochromatyny w funkcjonowaniu jąderka (Nemeth, 2018). Pierwszą poznaną funkcją jąderka jest synteza rybosomowego RNA (rRNA) i biogeneza rybosomów (Konikkat i in., 2017; Derenzini i in., 2017; Mangan i in., 2017).

Jąderka komórkowe ssaków są trójdzielne i składają się z:

- FC (ang. *fibrillar center*) – ośrodka włóknistego, w którym lokalizuje polimeraza RNA I (RNA Pol I) oraz czynniki takie jak topoizomeraza DNA typu I i czynnik transkrypcyjny UBF (ang. *upstream binding transcription factor*);

- DFC (ang. *dense fibrillar component*) – gęstego składnika włóknistego, który otacza FC i zawiera czynniki transkrypcyjne, nowo syntetyzowane pre-rRNA oraz czynniki uczestniczące w dojrzewaniu pre-rRNA; DFC jest głównym miejscem syntezy pre-rRNA (Huang, 2002);
- GC (ang. *granular component*) – składnika ziarnistego, który otacza FC i DFC i zawiera białka rybosomowe, czynniki składania rybosomów oraz prawie ukończone podjednostki pre-rybosomowe; GC jest miejscem zdarzeń związanych z późnym dojrzewaniem – rRNA jest składane z białkami rybosomowymi w podjednostki rybosomowe (Coute i in., 2006; Tsekrekou i in., 2017; Farley i in., 2015; Mangan i in., 2017) (Fig. 1).

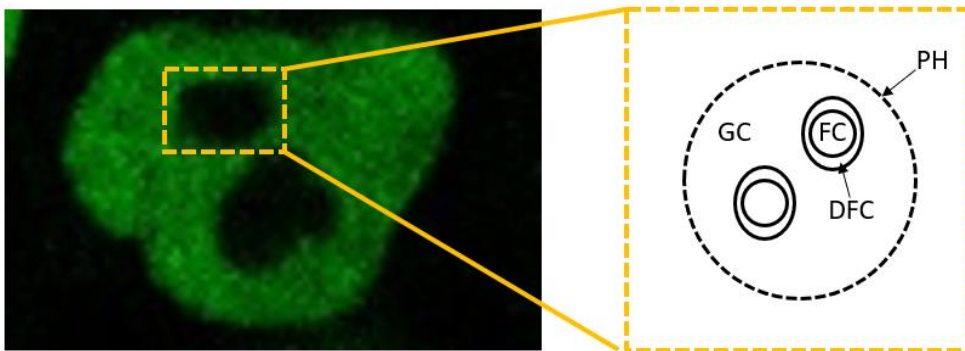


Figura 1. Zdjęcie z mikroskopu konfokalnego, komórki HeLa WT z wyodrębnionym jądrem komórkowym. Jądro przedstawiono na schemacie obok, zaznaczając: FC – ośrodek włóknisty, DFC – gęsty składnik włóknisty, GC – składnik ziarnisty oraz PH – heterochromatynę okołojąderkową.

Oprócz rRNA, w jąderku komórkowym znajdują się również inne rodzaje RNA, głównie małe jąderkowe RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNA*), które wchodzi w skład kompleksów snoRNP (ang. *small nucleolar ribonucleoproteins*), katalizujących potranskrypcyjne modyfikacje rRNA. Dodatkowo, w jąderku wykryto również cząsteczkę SRP (ang. *signal recognition particle*) oraz spliceosomowe U snRNA (ang. *small nucleolar RNA*) wraz z białkami spliceosomowymi, tworzące U snRNP (ang. *small nuclear ribonucleoproteins*), które wchodzi w skład spliceosomu. Rola jąderka w procesie biogenezy snRNP nie jest jeszcze jasna. Wykazano również, że transkrypty pochodzące z intronowych sekwencji powtórzonych Alu, syntetyzowanych przez polimerazę RNA II, są wzbogacone w jąderkach i wymagane do jego integralności.

Nadekspresja AluRNA prowadziła zarówno do zwiększenia rozmiaru jąderek, jak i do podwyższonego poziomu pre-rRNA (Caudron-Herger i in., 2015). Wiadomo również, że AluRNA oddziałuje z białkami wiążącymi RNA: nukleoliną (NCL), fibrylaryną (FIB/FBL) i nukleofosminą (NPM1), które są zlokalizowane w jąderku i kontrolują zjawisko separacji faz ciec-ciecz, wymagane do utrzymania struktury jąderka (Caudron-Herger i in., 2015; Nemeth, 2018).

Wysoka zawartość kwasów nukleinowych i białek rybosomowych tworzy unikalne środowisko i wpływa na ogólną architekturę jąderka (Korsholm i in., 2020). Pomimo ścisłego upakowania DNA, ze względu na występujące w nim powtórzone sekwencje genów rRNA, jąderko jest najbardziej aktywnym transkrypcyjnie rejonem komórkowym (Chen i Huang, 2001). Miejsca zawierające kopie genów rRNA nazywane są regionami organizatora jąderkowego, NOR (ang. *nucleolar organizer regions*) i znajdują się na chromosomach 13, 14, 15, 21 i 22 (Schofer i in., 2018). Pomędzy jednostkami rDNA znajdują się długie odstępy –międzygenowe przestrzenie, IGS (ang. *intergenic spacer*) o długości około 30 kb, które zawierają elementy regulatorowe. Gen rRNA jest transkrybowany do jednostki policistronowej 47S pre-rRNA, która jest dalej przycinana i modyfikowana do 18S, 5,8S i 28S rRNA. W kolejnym etapie, cząsteczki rRNA wraz z 5S rRNA są składane w duże i małe podjednostki rybosomowe (Cerqueira i Lemos, 2019; Correll i in., 2019; Coute i in., 2005; Floutsakou i in., 2013; Mangan i in., 2019; Nemeth i Grummt, 2018).

rRNA jest syntezowany przez RNA Pol I, przy udziale czynnika UBF (ang. *upstream binding factor*) i czynnika SL1 (ang. *selective factor 1*). W dzielących się komórkach wyższych eukariotów, transkrypcja rDNA jest zatrzymywana w profazie, równoległe z demontażem jąderek, a następnie przywracana ponownie podczas telofazy, gdy jąderka są ponownie formowane (Boisvert i in., 2007; Olson i in., 2005; Sirri i in., 2008). Szczyt tempa transkrypcji genów rybosomowych osiągany jest w fazie S cyklu komórkowego i pozostaje podwyższony w fazie G2 (Villacis i in., 2018). Równoległe do syntezy pre-rRNA, rRNA jest modyfikowany przez snoRNP, które również są zlokalizowane w jąderkach. snoRNP kierują specyficzną dla danego miejsca w rRNA metylacją 2'-O-rybozy (katalizowaną przez 2'-O-metylotransferazę fibrylaryną) oraz izomeryzacją urydyny do pseudourydyny (katalizowaną przez pseudourydynową syntazę dyskerynową, dyskerynę, DKC1) (Maden, 1990; Filipowicz i in., 2002; Kiss i wsp., 2006; Reichow i wsp., 2007).

Jąderko nie jest tylko maszyną do syntezy rybosomów. W skład proteomu jąderkowego wchodzi ponad 4500 różnych białek. Należą one do różnych klas funkcjonalnych, związanych ze strukturą rybosomów, biogenezą rybosomów, strukturą chromatyny, metabolizmem mRNA czy translacją. Oprócz biogenezy rybosomów, białka te są zaangażowane w takie szlaki komórkowe jak: śmierć komórki, cykl komórkowy, proliferacja, metabolizm telomerów, produkcja energii, replikacja, rekombinacja i naprawa DNA (Coute i in., 2006, Villacis i in., 2018, Grummt, 2013, Andersen i in., 2005, Pendle i in., 2005). Należy podkreślić, że profil proteomu jąderkowego jest dynamiczny i może być modulowany przez zmiany fizjologii komórki w trakcie cyklu komórkowego, a także może podlegać wpływowi stresu, zdarzeń sygnalizacyjnych, rozwoju nowotworu i infekcji wirusowych (Andersen i in., 2005; Emmott i in., 2009; Raska i in., 2006; Lam i in., 2010). Białka mogą być lokalizowane w jąderku również w celu ich modyfikacji. Ponadto, jąderko jest rezerwuarem białek „nierybosomowych”, zapewniając dogodny mechanizm regulacji procesów komórkowych poprzez czasową sekwestrację i uwalnianie białek. Ciągła wymiana białek pomiędzy jąderkami a otaczającą je nukleoplazmą została potwierdzona doświadczalnie przy użyciu technik mikroskopowych (Phair i in., 2000 oraz Chen i in., 2001). Przepływ białek w kierunku „do” i „z” jąderka obserwowano w odpowiedzi na różne stresory środowiskowe (promieniowanie UV, hipoksja, głodzenie) lub leczenie farmakologiczne (np. aktynomycyną D). Jąderko jest także miejscem zatrzymywania białek regulujących cykl komórkowy, np. kinaz lub białek regulacyjnych mitozy i mejozy, które są uwalniane z jąderka w sposób zależny od cyklu komórkowego (Visintin & Amon, 2000; Coute et al., 2005). W jąderkach zidentyfikowano również czynniki zaangażowane w regulację starzenia komórki i apoptozy.

Warto podkreślić, że produkcja rybosomów jest procesem wysoce energochłonnym. Dlatego też funkcja jąderka jest ściśle powiązana ze wzrostem i proliferacją komórek. W rzeczywistości, prawie wszystkie szlaki sygnałowe, które wpływają na te procesy, bezpośrednio regulują też syntezę rRNA. Jądro komórkowe monitoruje sygnały stresu komórkowego i przekazuje je do maszynerii transkrypcyjnej w jąderku. W rezultacie, w warunkach stresu synteza rRNA jest wyłączana w celu zaoszczędzenia energii, która jest wymagana do utrzymania homeostazy komórkowej. W odpowiedzi na szereg stresów, jąderko aktywuje szlak zwany NSP (ang. *nucleolar surveillance pathway*), który prowadzi do nagromadzenia białka p53. Podwyższony poziom p53 prowadzi do zaburzeń biogenezy i funkcji rybosomów, zatrzymania cyklu

komórkowego, a w skrajnych przypadkach do śmierci komórki na drodze apoptozy (Villacis i in., 2018). Jąderko jest również zaangażowane w różnicowanie komórek i transformację nowotworową. Intensywnie dzielące się komórki nowotworowe wymagają wyższego tempa biogenezy i wzrostu rybosomów, stąd rozmiar i liczba jąderka na komórkę znacznie wzrasta (Villacis i in., 2018).

Warto wspomnieć, że mutacje lub delecje:

- genów związanych z biogenezą rybosomów,
- genów związanych z syntezą lub modyfikacją rRNA,
- genów kodujących białka związane z rybosomami,

mogą powodować choroby zwane "rybosomopatiami". Należą do nich m.in. anemia Diamond Blackfana, dyskeratoza wrodzona, czy zespół Shwachmana-Diamonda (Villacis, 2018). Zmiany w jąderkach są również powszechne w wielu zaburzeniach neurologicznych związanych z wiekiem, w tym w chorobie Parkinsona, Huntingtona i Alzheimerera.

1.3. Naprawa uszkodzeń rDNA

Wysoki poziom transkrypcji genów rRNA oraz wielokrotnie powtórzone sekwencje tych genów sprawiają, że rDNA jest podatny na uszkodzenia (Tubbs i Nussenzweig, 2017). rDNA jest jednym z regionów, które podlegają najczęstszym rearanżacjom chromosomalnym w nowotworach. Dlatego też mechanizmy jąderkowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA, n-DDR (ang. *nucleolar DNA damage response*), istotne w utrzymaniu stabilności genomu, stały się celem badań przeciwnowotworowych (Velichko i in., 2021).

Szacuje się, że pojedyncza komórka przechodzi dziesiątki tysięcy zmian w DNA w ciągu doby. Zmiany te dotyczą pojedynczych zasad (deaminacja, depurynacja, depirymidynacja); jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć nici DNA, DSB (ang. *double-strand breaks*). DSB są najrzadziej występującym, ale jednocześnie najbardziej szkodliwym rodzajem uszkodzeń DNA (Blokhiinaa i Buchwaltera, 2020). DSB mogą powstawać jako konsekwencja stresu replikacyjnego lub mogą być indukowane przez substancje chemiczne/enzymy a także promieniowanie jonizujące, IR (ang. *ionizing radiation*) (Vitor i in., 2020). Komórki wykształciły dwie główne ścieżki odpowiedzi na DSB: niehomologiczne łączenie końców, NHEJ (ang. *non-homologous end joining*), która jest szybszą, ale mutagenną ścieżką ponownego łączenia nici DNA (Scully i in., 2019), oraz rekombinację homologiczną, HR (ang. *homologous recombination*), która

jest wolniejszą ścieżką wymagającą homologicznych sekwencji DNA (Hustedt i Durocher, 2016; van Sluis i McStay, 2015). Na wybór ścieżki - NHEJ czy HR - ma wpływ wiele czynników, w tym: cykl komórkowy, rodzaj uszkodzenia, środowisko chromatynowe i aktywność transkrypcyjna uszkodzonego locus (Scully i in., 2019). NHEJ jest aktywny przez cały cykl komórkowy, podczas gdy ścieżka HR zwykle jest wykorzystywana do naprawy w fazie S i G2, gdy dostępne są chromatydy siostrzane (Karanam i in., 2012). HR jest preferowanym mechanizmem naprawczym szczególnie dla genów aktywnych w fazie G2 (Aymard i in., 2014) (Fig. 2).

W określonych warunkach, DSB mogą być również naprawiane za pomocą innych, alternatywnych ścieżek, takich jak SSA (ang. *single-strand annealing*) i mikrohomologiczne łączenie zasad, MMEJ (ang. *microhomology-mediated end joining*) zwane również alternatywnym NHEJ, alt-NHEJ (Scully i in., 2019). W porównaniu z NHEJ i HR, ścieżki te są bardziej mutagenne i podatne na błędy, mogą też negatywnie wpływać na integralność rDNA. W związku z tym, mechanizm naprawy rDNA przez SSA i MMEJ jest też znacznie rzadziej wykorzystywany w komórkach ssaków.

1.3.1 Reorganizacja jąderka i tworzenie czapeczek jąderkowych

Zaburzenia w rDNA mogą powodować powstawanie tzw. "czapeczek jąderkowych" (ang. *nucleolar caps*), tj. inwersji jąderka, w wyniku której ośrodki FC i DFC ulegają kondensacji i wychodzą poza ośrodek GC. W jąderkach zachowana jest struktura dwufazowa, gdzie ośrodek DFC jest zwrócony w stronę ośrodka GC, a ośrodek FC jest skierowany do nukleoplazmy (Korsholm i in., 2020) (Fig. 2). Tworzenie czapeczek jąderkowych jest szybką (< 1 godz.) odpowiedzią na farmakologiczne zaburzenie transkrypcji RNA Pol I po traktowaniu aktynomycyną D (Shaw-Tal i in., 2005; Floutsakou i in., 2013), a wolniejszą (2-6 godz.) odpowiedzią na uszkodzenie rDNA (Korsholm i in., 2019; van Sluis i in., 2015; Mooser i in., 2020; Pefani i in., 2018). W tym drugim przypadku, uszkodzenia indukowane w dowolnym miejscu powtórzenia rDNA, również w obrębie sekwencji IGS, ale nie w genomowym DNA flankującym sekwencję rDNA, indukuje tworzenie czapeczek jąderkowych (van Sluis i in., 2015). Tworzenie czapeczek jąderkowych w odpowiedzi na jakikolwiek bodziec zbiega się z hamowaniem transkrypcji i jest od niego zależne. Kiedy indukowane są uszkodzenia rDNA, aktywowane są kinazy ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (ang. *ataxia telangiectasia and Rad3-related*), które pośredniczą w hamowaniu transkrypcji (Mooser i in., 2020). Odkryto, że zakłócenie działania kinaz ATM lub ATR, ale nie

kinazy DNA-PKcs (ang. *DNA dependent protein kinase catalytic subunit*), zachowuje aktywność RNA Pol I i blokuje tworzenie czapeczek jąderkowych (Harding i in., 2015; Warmerdam i in., 2016; Blokhina i Buchwalter, 2020).

Kiedy kinaza ATM ulega aktywacji w jąderku, reguluje ona aktywnością szeregu białek jąderkowych. Głównym celem kinazy ATM jest białko jąderkowe Treacle, określane również jako TCOF1 (ang. *treacle ribosome biogenesis factor 1*), które z kolei rekrutuje białko uszkodzeń DNA, NBS1 (ang. *nibrin*). NBS1 wchodzi w skład kompleksu MRN, do którego należą również białka MRE11 i RAD50. Oba białka, Treacle i NBS1, są wymagane do jąderkowego zahamowania transkrypcji (Kruhlak i in., 2007; Larsen i in., 2014). Treacle rekrutuje również białko TOPBP1 (ang. *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*), wymagane do aktywacji kinazy ATR (Mooser i in., 2020). TOPBP1 wiąże się z fosforylowaną przez ATM C-końcową domeną Treacle; Treacle jednocześnie wiąże NBS1, które też jest wymagane do rekrutacji TOPBP1. TOPBP1 wchodzi również w interakcję z demetylazą histonową, JMJD6 (ang. *jumonji domain containing protein 6*) (Fig. 2).

Tworzenie się czapeczek jąderkowych wymaga również kompleksu LINC (ang. *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) i aktyny, które są zaangażowane w aktywne przemieszczanie DSB podczas HR, ale nie są one wymagane do zahamowania transkrypcji w odpowiedzi na uszkodzenia rDNA (Marnef i in., 2019).

Segregacja jąderek w odpowiedzi na uszkodzenia rDNA wiąże się ze zmianami w środowisku rekombinacji homologicznej. Jednym z czynników wymaganych do efektywnego wyciszenia transkrypcji rDNA i tworzenia czapeczek jąderkowych jest kompleks HUSH (ang. *human silencing hub*), który promuje trimetylację H3K9 (ang. *histone H3 lysine 9*) (Tchasovnikarova i in., 2015; Marnef i in., 2019). Podobnie, fosforylacja histonu H2B na serynie 14 (H2BS14) również odgrywa ważną rolę w odpowiedzi jąderka na uszkodzenia rDNA. Za fosforylację H2B w odpowiedzi na uszkodzenia rDNA odpowiada zlokalizowana w jąderkach kinaza MST1 (ang. *macrophage stimulating 1*) związana z MST2 (ang. *macrophage stimulating 2*), która jest aktywowana przez kinazę ATM. Przejściowe nagromadzenie modyfikacji H2BS14 jest wymagane do zahamowania transkrypcji rDNA i segregacji jąderek (Pefani i in., 2018). W innych miejscach genomu zaobserwowano, że z miejscami H2BS14 na uszkodzonym DNA kolokalizuje fosforylowana forma histonu γ H2AX (Fernandez-Capetillo i in., 2004).

ATM i ATR nie są jedynymi kinazami aktywowanymi podczas DSB w jąderkach. Kinazy Chk1 (ang. *checkpoint kinase 1*) i Chk2 (ang. *checkpoint kinase 2*), wymagane do zatrzymania cyklu komórkowego, mogą przyczyniać się do wyciszenia transkrypcji poniżej szlaku działania kinaz ATM/ATR.

1.3.2 NHEJ

Ścieżka naprawcza NHEJ zachodzi w aktywnie transkrybujących jąderkach komórkowych i naprawia większość DSB w rDNA, bez trwałej aktywacji ATM i restrukturyzacji jąderek. NHEJ jest inicjowana przez związanie do uszkodzonego DNA kompleksu białek Ku70/80 (białko Ku70 jest kodowane przez gen *XRCC6*, a białko Ku80 jest kodowane przez gen *XRCC5*), związanie to jest niezależne od kompleksu MRN. Kompleks Ku70/80 występuje w całej nukleoplazmie. Podczas NHEJ, Ku70/80 rekrutuje czynniki naprawcze, takie jak kinaza DNA-PK, ligaza DNA IV oraz białko naprawy DNA XRCC4 (Scully i in., 2019; Bordelet i in., 2019). Zaburzenie lokalizacji jąderkowej kinazy DNA-PK po uszkodzeniu rDNA skutkuje zahamowaniem ścieżki naprawczej NHEJ, co z kolei prowadzi do wzrostu liczby DSB w rDNA, zahamowania transkrypcji i tworzenia czapeczek jąderkowych (Marnef i in., 2019; Harding i in., 2015) (Fig. 2).

1.3.3 HR

W przeciwieństwie do naprawy uszkodzeń rDNA na ścieżce NHEJ, która zachodzi w obrębie jąderek, naprawa na ścieżce HR jest najbardziej widoczna w czapeczkach jąderkowych. Naprawa HR jest inicjowana w momencie związania kompleksu MRN, który katalizuje resekcję uszkodzonych końców DNA, czyli usunięcia nukleotydów w celu odsłonięcia odcinka jednoniciowego DNA, ssDNA (ang. *single stranded DNA*). MRN działa w połączeniu z: białkiem CtIP (ang. *C-terminal binding protein 1 (CtBP1) interacting protein*), egzonukleazą 1, EXO1, endonukleazą DNA2 i helikazą zespołu Blooma, BLM. ssDNA jest natychmiast wiązany przez kompleks RPA (ang. *replication protein A*), zawierający białko RPA2 (Soniati i in., 2019). RPA jest następnie wypierany przez białko RAD51 (ang. *DNA repair protein RAD51*), które wraz z białkiem BRCA1 (ang. *breast cancer type 1 susceptibility protein*) tworzy rusztowanie dla sekwencji homologicznych (Scully i in., 2019). Sekwencja homologiczna i resekowane ssDNA ulegają hybrydyzacji, powstaje figura krzyżowa Hollidaya i następuje synteza uszkodzonego regionu DNA (homologiczna sekwencja jest wykorzystywana jako matryca do syntezy DNA *de novo*, w celu zastąpienia uszkodzonej

sekwencji). Niektóre etapy HR zachodzą wewnątrz jąderka, jeszcze przed utworzeniem czapeczek jąderkowych. Na przykład, fosforylowane białko Treacle rekrutuje białka NBS1 i MRE11 do DSB we wnętrzu jąderka, te komponenty MRN przemieszczają się następnie do czapeczek jąderkowych wraz z rDNA, gdzie wchodzi w kontakt z czynnikami naprawy, w tym: RAD51, RAD52 i BRCA1 (Korsholm i in., 2019; Larsen i in., 2014; Ciccia i in., 2014). Ogniska RPA, które wskazują na obecność reseowanego ssDNA, zostały opisane zarówno we wnętrzu jąderka, jak i w czapeczkach lub tylko w czapeczkach jąderkowych (Marnef i in., 2019; Mooser i in., 2020; van Sluis i in., 2015) (Fig. 2).

Wczesne czynniki sygnalizacyjne HR, czyli kompleks MRN i kinaza ATM, poprzedzają i wpływają na formowanie czapeczek jąderkowych. Brak NBS1 lub MRE11 hamuje tworzenie czapeczek jąderkowych. Jednakże, rola innych czynników HR w tworzeniu czapeczek jąderkowych jest bardziej złożona. Na przykład, zmniejszenie ilości CtIP, kofaktora resekcji, nie wpływa na tworzenie czapeczek jąderkowych, ale zaburza rekrutację innych czynników do tych struktur. Co ciekawe, wyciszenie CtIP wydaje się hamować przemieszczanie się ognisk NBS1 do czapeczek (Korsholm i in., 2019), co sugeruje mechanizm sprzężenia zwrotnego, biegnącego od CtIP do kompleksu MRN. Z drugiej strony, również brak czynników resekcyjnych, BLM/DNA2 i RPA2, zapobiega tworzeniu czapeczek jąderkowych. Sugeruje się, że resekcja może promować formowanie czapeczek jąderkowych poprzez generowanie sygnału aktywującego ATR. Jednak fakt, że kinaza ATR może być aktywowana w wyniku bezpośredniej interakcji Treacle wskazuje, że aktywacja kinazy ATR może zachodzić niezależnie od resekcji w obrębie jąderka (Mooser i in., 2020).

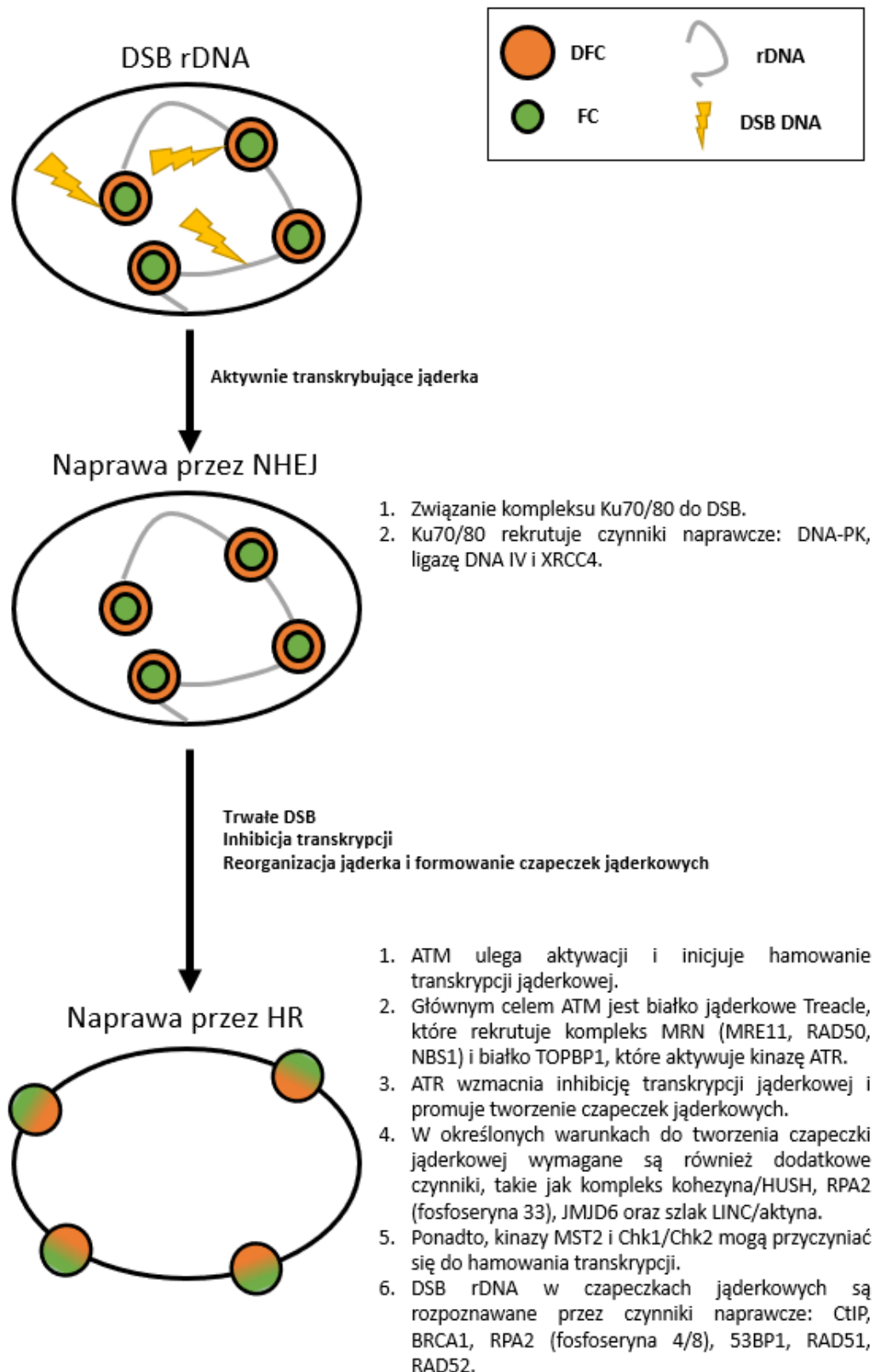


Figura 2. Odpowiedź na DSB w rDNA. W naprawie DSB uczestniczą dwa szlaki: niehomologiczne łączenie końców- NHEJ, w którym transkrypcja nie zostaje zahamowana oraz rekombinacja homologiczna- HR, gdzie ATM inicjuje inhibicję

transkrypcji i następuje reorganizacja jąderka, w wyniku której powstają czapeczki jąderkowe. W przypadku białka RPA2 seryna jest fosforylowana w pozycji 33 lub 4/8.

1.3.4 Naprawa uszkodzeń jednoniciowych rDNA

Tematyka naprawy uszkodzeń ssDNA w rDNA jest dosyć słabo przebadana, chociaż są one liczne, biorąc pod uwagę częstotliwość występowania pętli R w obrębie aktywnych powtórzeń rDNA. Szlak naprawy przez wycinanie nukleotydów, NER (ang. *nucleotide excision repair*), usuwa i naprawia jednoniciowe zmiany w całym genomie. Uszkodzenia rozpoznawane przez NER obejmują wiązania krzyżowe wywołane promieniowaniem UV, duże modyfikacje pojedynczych zasad oraz pętli R. W szlaku NER dochodzi do wycięcia uszkodzonego ssDNA i syntezy DNA *de novo*, z wykorzystaniem nieuszkodzonego ssDNA jako matrycy (Spivak, 2015). NER można podzielić na: szlak globalnej naprawy genomowej, GGR (ang. *global genome repair*), który opiera się na działaniu nukleazy XPF/ERCC1 usuwającej zmiany na każdej z nici DNA (Spivak, 2015), oraz szlak naprawy sprzężonej z transkrypcją, TCR (ang. *transcription-coupled repair*), który polega na specyficznej naprawie zmiany tylko na transkrybowanej nici DNA i opiera się na działaniu enzymów CSA/CSB (Cockayne Syndrom A i B). TCR został po raz pierwszy opisany jako specyficzna ścieżka, która jest indukowana, gdy RNA Pol II zostaje zatrzymana przez zmianę na nici matrycowej (Spivak, 2015). Co ciekawe, w przeciwieństwie do regionów genomu transkrybowanych przez RNA Pol II, rDNA nigdy nie ulega naprawie na ścieżce TCR. Zamiast tego, w naprawie zmian ssDNA w rDNA wywołanych przez promieniowanie UV lub modyfikacje chemiczne, uczestniczy szlak GGR (Christians i in., 1993; Yang i in., 2019). Nie jest natomiast do końca wyjaśnione, czy NER rozwiązuje pętli R w obrębie rDNA. Natomiast, w innych miejscach genomu nukleazy szlaku NER, XPF/ERCC1 i XPG, uczestniczą w przetwarzaniu pętli R w DSB, które następnie są rozpoznawane i naprawiane na szlaku naprawy DSB (Sollier i in., 2014; Makharashvili i in., 2018). Niemniej, należy pamiętać, że przekształcenie pętli R w DSB zwiększa prawdopodobieństwo naprawy nieefektywnej lub podatnej na błędy, co z kolei prowadzi do niestabilności genomu.

1.4. Rola hnRNP UL1 w naprawie uszkodzeń DNA

hnRNP UL1 bezpośrednio oddziałuje z białkiem p53 i hamuje jego aktywność transkrypcyjną w odpowiedzi na promieniowanie UV (Barral i in., 2005). hnRNPUL1

oddziałuje także z kompleksem MRN poprzez białko NBS1. Białko hnRNP UL1, wraz z kompleksem MRN i białkiem CtIP, jest rekrutowane do miejsca uszkodzenia DNA i uczestniczy w naprawie DSB (Polo i in., 2012). Rekrutacja ta wymaga metylacji hnRNP UL1 przez białkową N-metylotransferazę argininy 1, PRMT1 (ang. *protein arginine N-methyltransferase 1*) (Lander i in., 2001). Białko hnRNP UL1 zostało również opisane jako białko biorące udział w lokalizacji uszkodzeń DNA i/lub ich naprawy w kompleksie z polimerazą poli [ADP-rybozy] 1, PARP1 (ang. *poly [ADP-ribose] polymerase 1*), jednym z najważniejszych białek wymaganych do utrzymania stabilności genomu (Hong i in., 2013). Ponadto, białko hnRNP UL1 uczestniczy w odpowiedzi na infekcję wirusową w ścieżce zależnej od kinazy ATR (Barral i in., 2005; Hong i in., 2013). Dodatkowo, hnRNP UL1 oddziałuje z długim niekodującym RNA, lncRNA (ang. *long non-coding RNA*), DDSR1 (ang. *DNA damage-sensitive RNA1*), który wpływa na proliferację komórek, sygnalizację uszkodzeń DNA i zdolność do naprawy DNA na drodze HR. Interakcja DDSR1 z hnRNP UL1 reguluje dostępnością białka BRCA1 i podjednostki kompleksu BRCA1-A-RAP80 do DSB (Sharma i in., 2015).

Co interesujące, u pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym, ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), odkryto heterozygotyczne mutacje w genie białka hnRNP UL1, R639C i R468C. Wyniki pracy doktorskiej Kenny'ego M. Pratta (2015) wykazały, że komórki pacjentów z ALS skorelowanym z tymi mutacjami nie miały defektów odpowiedzi na DSB ani błędnej lokalizacji białka, ale zdolność wiązania ssDNA/RNA przez hnRNP UL1 była wyraźnie zmniejszona.

1.5. Wzajemne interakcje hnRNP UL1, FUS i U7 snRNA

Białko FUS (ang. *fused in sarcoma*) również wiąże się z DNA i pośredniczy w utrzymaniu stabilności genomu, rekombinacji DNA i szlaku naprawy DNA (Lagier-Tourenne i in., 2010; Sama i in., 2014; Yang i in., 2010; Dormann i in., 2013). Białko FUS jest szybko rekrutowane do miejsc DSB w sposób zależny od polimerazy PARP-1, a jego wyciszenie znacząco obniża wydajność naprawy DNA zarówno przez mechanizm HR, jak i NHEJ (Mastricola i in., 2013; Rulten i in., 2013). W odpowiedzi na DSB, FUS tworzy też kompleks z deacetylazą histonów HDAC-1 (ang. *histone deacetylases*), która jest krytycznym czynnikiem szlaku naprawy DNA w neuronach postmitotycznych (Wang i in., 2013). FUS jest białkiem zlokalizowanym głównie w jądrze komórkowym, jednakże występuje również w cytoplazmie, gdyż uczestniczy w transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy (Zinszner i in., 1997). Białko FUS zostało również zidentyfikowane w

proteomie jąderkowym, jednak jego funkcja w tym przedziale komórkowym nie została do tej pory opisana (Andersen i in., 2005, Kar i in., 2011). Jąderkowa lokalizacja białka FUS jest wynikiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (Martinez-Macias i in., 2019).

Obok zaangażowania w metabolizm RNA i odpowiedź komórkową na DSB, wśród podobieństw charakteryzujących oba białka, FUS i hnRNP UL1, wymienić należy również interakcję z cząstką U7 snRNP (ang. *U7 small nuclear ribonucleoprotein*).

Cząstka U7 snRNP to kompleks złożony z białek rdzeniowych Sm/Lsm (SmB/B', SmD3, SmG, SmE, SmF, Lsm10, Lsm11) oraz U7 snRNA. U7 snRNP jest kluczowym czynnikiem biorącym udział w dojrzewaniu 3' końca pre-mRNA zależnych od replikacji histonów rdzeniowych (Dominski i in., 2007). Aktywność ta jest silnie skorelowana z fazą S cyklu komórkowego, podczas której zachodzi replikacja, wymagająca ogromnej puli białek histonowych do upakowania nowo syntetyzowanego DNA. Poziom ekspresji genów histonów wzrasta ~35-krotnie podczas przejścia faz G1/S i gwałtownie spada ponownie pod koniec fazy S. Przyrost mRNA histonów w fazie S wynika, między innymi, z wydajnego procesu dojrzewania 3' końca histonowych transkryptów. Natomiast, spadek poziomu mRNA histonów na granicy faz S/G2 jest efektem szybkiej destabilizacji mRNA histonów. Dojrzewanie 3' końca zależnych od replikacji transkryptów histonów rdzeniowych jest odmienne od dojrzewania 3' końca innych eukariotycznych pre-mRNA. Histonowy pre-mRNA nie jest poliadenylowany, a jedynie przecinany tuż za zakonserwowaną strukturą pętli. Przecięcie endonukleolityczne zachodzi poniżej struktury pętli, ale przed rejonem bogatym w purynę, zwanym motywem HDE (ang. *histone downstream element*), te dwa elementy są oddzielone od siebie o ~15 nukleotydów. HDE oddziałuje poprzez oddziaływanie par zasad z 5' końcem U7 snRNA. Oddziaływanie HDE:U7 snRNP indukuje rekrutację pozostałych składników kompleksu dojrzewania końca 3' histonowego pre-mRNA. Konserwatywna struktura pętli jest związana z białkiem SLBP (ang. *stem-loop binding protein*) i stabilizuje wiązanie U7 snRNP do histonowego pre-mRNA. Należy zwrócić szczególną uwagę na to, że histonowe pre-mRNA na końcu 3' nie posiadają końca poli(A), co pozwala na szybką i kontrolowaną ekspresję genów histonowych podczas cyklu komórkowego, zapewniając prawidłowy poziom białek histonowych niezbędnych przy pakowaniu nowo zsyntezowanego DNA. Jeżeli któreś z pre-mRNA histonów rdzeniowych jest poliadenylowane na końcu 3' znaczy to, że doszło do nieprawidłowego przetwarzania, co może skutkować zaburzeniami w funkcjonowaniu białek histonowych podczas cyklu komórkowego.

Poziom cząstki U7 snRNP pozostaje stały podczas cyklu komórkowego. Niewiele jednak wiadomo na temat innych funkcji U7 snRNP. Wykazano, że U7 snRNA (poza kompleksem U7 snRNP) może działać jako regulator transkrypcji, gdyż obniża aktywność promotora genu MDR1 poprzez hamowanie wiązania tego motywu DNA przez czynnik transkrypcyjny NF-Y (Higuchi i in., 2008). Wykazano również, że podczas zatrzymania cyklu komórkowego, hnRNP UL1 w kompleksie z U7 snRNP hamuje ekspresję zależnych od replikacji genów histonowych (Ideue i in., 2012). Na podstawie badań Laboratorium Dojrzewania RNA wiadomo również, że hnRNP UL1 oddziałuje z białkiem FUS w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego (Raczynska i in., 2015).

Celem jednego z projektów badawczych, w których brałam udział, było opisanie roli U7 snRNP, FUS i hnRNP UL1 w zahamowaniu ekspresji genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego. Postawiona hipoteza badawcza zakładała, że wzajemne interakcje tych trzech czynników, U7 snRNP, FUS i hnRNP UL1, zmieniają się w różnych fazach cyklu komórkowego, a poza fazą S wpływają negatywnie na ekspresję genów histonów zależnych od replikacji. Na podstawie uzyskanych wyników (przedstawionych w tej pracy doktorskiej) można przypuszczać, że białko hnRNP UL1 nie wpływa znacząco na inhibicję ekspresji genów histonowych w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego. Natomiast zauważyliśmy, że w fazie S cyklu komórkowego białko hnRNP UL1 może pełnić rolę regulatora poziomu ekspresji genów histonowych zależnych od replikacji. Jednakże, są to wyniki wstępne, wymagające kolejnych eksperymentów.

Interesujące jest to, że wszystkie trzy czynniki są związane z zaburzeniem neurologicznym, ALS. Mutacje zarówno w genie białka FUS jak i hnRNP UL1, zostały zidentyfikowane u pacjentów z ALS (Deng i in., 2014; Pratt, 2015). W Laboratorium Dojrzewania RNA pokazaliśmy również w liniach komórek neuroblastomy SH-SY5Y oraz Hela, że U7 snRNA/snRNP jest zlokalizowany w agregatach cytoplazmatycznych wraz z białkiem FUS niosącym mutacje związane z ALS. Taka niewłaściwa lokalizacja prowadzi do zaburzenia jądrowej aktywności zarówno białka FUS jak i cząstki U7 snRNP. W konsekwencji, w badanych liniach komórkowych zaobserwowaliśmy obniżoną transkrypcję genów histonów zależnych od replikacji oraz zaburzenia dojrzewania końca 3' histonowych pre-mRNA (Gadgil i in., 2021).

2. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było wyjaśnienie funkcji białka hnRNP UL1 w komórkach ludzkich oraz zweryfikowanie poniższych hipotez badawczych:

- Białko hnRNP UL1 uczestniczy w transkrypcji rDNA;
- Białko hnRNP UL1 bierze udział w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia rDNA;
- Białko hnRNP UL1 jest wymagane dla integralności genomu.

Ponadto, podjęłam również próbę opisanie wzajemnych interakcji pomiędzy hnRNP UL1, FUS i U7 snRNP, oraz określenia roli białka hnRNP UL1 w inhibicji genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego, którą pełni wraz z białkiem FUS i cząstką U7 snRNP.

3. Materiały

3.1. Ludzkie linie komórkowe HEK 293T i HeLa

Materiał biologiczny użyty do eksperymentów został pozyskany z ludzkich linii komórkowych HEK 293T: typu dzikiego - HEK WT (ang. *wild type*); z wyciszeniem genu *HNRNPUL1* - HEK UL1 KO (ang. *knockout*) przygotowane z wykorzystaniem systemu CRISPR-Cas9 (rozdział 4.1.4) oraz ze stabilną nadekspresją białka hnRNP UL1 - HEK UL1 OE (ang. *overexpression*) uzyskane z wykorzystaniem technologii MultiMam™ Stable (rozdział 4.1.5). Ponadto, w pracy eksperymentalnej korzystano z linii HeLa typu dzikiego - HeLa WT oraz z linii HeLa z wyciszeniem genu *FUS* - HeLa FUS KO, które są dostępne w naszym laboratorium.

Komórki były hodowane w pożywce DMEM (ang. *dulbecco's modified eagle's medium*) (Lonza) zawierającej 4,5 g/L glukozy i L-glutaminy oraz suplementowanej dodatkiem 5-10% FBS (ang. *fetal bovine serum*) (v/v) i roztworem antybiotyków: 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny, 0,25 µg/ml amfoterycyny B (Sigma).

Pozostałe odczynniki używane w hodowli komórkowej to: trypsyna pH 7,2 (Pracownia Chemii Ogólnej NTD PAN) oraz bufor PBS (ang. *phosphate buffered saline*) (Sigma).

3.2. Szczep bakterii

Szczep *Escherichia coli* - DH5α: supE44ΔlacU169(ø80lacZΔM15)hsdR 17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

3.3. Enzymy, bufor i odczynniki

Izolacja RNA

- TRIzol (Ambion) – 38% nasycony fenol kwaśny, 0,8 M tiocyjanian guanidyny, 0,4 M tiocyjanian amonu, 5 mM EDTA, 0,5% SDS (ang. *sodium dodecyl sulphate*), 0,1 M octan sodu pH 5,0, 5% glicerol

Trawienie DNA podczas procedury izolacji RNA

- TURBODNase™ 50 U/µl (Ambion)
- Bufor do Turbo DNase™ 10x (Ambion) - skład zastrzeżony przez producenta

Synteza cDNA (ang. *complementary DNA*)

- SuperScript™ III Reverse Transcriptase 200 U/µl (Invitrogen)
- RNasin 25 U/µl (Invitrogen)

- Bufor First-Strand 5x (Invitrogen) - 250 mM Tris-HCl (2-amino-2-hydroksymetylo- propano-1,3-diol) (pH 8,3 w 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂
- Polimeraza *E. coli* Poly(A) 5 U/μl (Invitrogen)
- Bufor miRNA-RT 2,5x (Thermo Scientific) – 1 M Tris-HCl, 2 M KCl, 100 mM DTT, 1M MgCl₂, 100 μM starter miRNA RT
- Mieszanina nukleotydów miRNA 5x (Thermo Scientific) – 100 mM dGTP, 100 mM dCTP, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 40 U/μl RiboLock, 10 mM rATP

Reakcja PCR (ang. *polymerase chain reaction*)

- Polimeraza Pfu DNA 2,5 U/μl (Thermo Scientific)
- Bufor Pfu DNA 10x (Thermo Scientific) – 200 mM, Tris-HCl (pH 8,8 w 25°C), 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml BSA (ang. *bovine serum albumin*), 1% Triton[®]X-100
- Polimeraza Dream Taq 5 U/μl (Thermo Scientific)
- Bufor Dream Taq 10x (Thermo Scientific) - 100 mM Tris-HCl (pH 9,0 w 25°C), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1% Triton[®]X-100

Defosforylacja końców 5' plazmidów

- Termoczuła alkaliczna fosfataza FastAP 1 U/μl (Promega)
- Bufor FastAP 10x (Promega) - 100 mM Tris-HCl (pH 8,0 w 37°C), 50 mM MgCl₂, 1M KCl, 0,2% Triton[®]X-100, 1 mg/ml BSA

Trawienie enzymami restrykcyjnymi

- Enzymy restrykcyjne FastDigest[®] 10 U/μl (Thermo Scientific)
- Bufor FastDigest[®] 10x (Thermo Scientific) – skład zastrzeżony przez producenta

Ligacja insertu do wektora

- Ligaza T4 DNA 5 U/μl (Thermo Scientific)
- Bufor T4 DNA 10x (Thermo Scientific) - 500 mM Tris-HCl (pH 7,5 w 25°C), 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 100 mM DTT

Elektroforeza w żelu agarozowym

- Bufor TBE 10x - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) (Bioshop), 95% kwas borowy, 20 mM EDTA
- Bufor obciążający 6x Orange do DNA - 10 mM Tris-HCl (pH 7,6 w 25°C), 0,03% ksylencjanol, 60 mM EDTA, 60% glicerol, 0,33% barwnik Orange G

- Bufor obciążający 2x do RNA - 95% formamid, 0,025% SDS, 0,025% błękit bromofenolowy (Sigma), 0,025% ksylencjanol FF, 0,5 mM EDTA
- Markery mas cząsteczkowych 1kb Plus lub 100bp Plus (Invitrogen)

Izolacja i pomiar stężenia białek

- Lekki bufor do izolacji białek - 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% Triton[®]X-100, 1x inhibitor proteaz wolny od EDTA (Roche)
- Odczynnik barwiący do oznaczania białek (ang. *protein assay dye reagent*) (Biorad) – skład zastrzeżony przez producenta
- BSA 10 mg/ml (Biolabs)

Immunoprecypitacja (IP)

- PBS-T (ang. *phosphate-buffered saline with Tween 20*) (Sigma) - 1x PBS, 0,1% Tween 20
- Kulki magnetyczne z białkiem G 25 µl/reakcję (Invitrogen)
- Kulki magnetyczne M2 anty-FLAG[®] 25µl/reakcję (Sigma)

Izolacja jąderek

- Bufor SI – 0,5 M roztwór sacharozy, 3 mM MgCl₂, 1x inhibitor proteaz wolny od EDTA, uzupełniono H₂O do 50 ml
- Bufor SII - 1,0 M roztwór sacharozy, 3 mM MgCl₂, 1x inhibitor proteaz wolny od EDTA, uzupełniono H₂O do 50 ml

Strącanie białek

- TCA (ang. *acidum trichloroaceticum*) – 10% TCA
- 0,5% Tween 20
- 90% aceton

Żele poliakrylamidowe oraz elektroforeza białek

- Bufor A - 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS
- Bufor B - 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS
- 30% poliakryloamid (BioShop)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina) (Sigma)
- 10% APS (ang. *ammonium persulfate*) (Sigma)
- Izopropanol C₃H₈O (P.P.H. „STANLAB” Sp. z o.o.)
- Bufor Laemmli 10x – 0,25 M Tris, 1,92 M glicyna, 1% SDS (BioShop)

- Markery białkowe: PageRuler™ Prestained Protein Ladder oraz PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
- Bufor obciążający do białek SSB 1x – 375 mM Tris-HCl (pH 6.8), 12% SDS, 60% glicerol (Roth), 200 mM DTT (Sigma), 0,1% błękit bromofenolowy

Transfer póluchy, barwienie membrany oraz immunodetekcja

- Bufor do transferu 10x – 0,25 M Tris-HCl (pH 8,3), 1,92 M glicyna i 0,1-0,25% SDS
- Bufor TBS 10x – 0,5 M Tris-HCl (pH 7,6), 1,5 M NaCl (Sigma)
- Roztwór Ponceau S (Sigma)
- Odczynnik do detekcji chemiluminescencji ECL (ang. *enhanced chemiluminescence*) (Amersham™)

Indukcja uszkodzeń DNA

- Etopozyd (ETO, 25 mM roztwór w DMSO (Dimetylosulfotlenek)) inhibitor topoiomerazy typu II (Sigma #E1383)
- Kamptotecyna (CPT, 12,5 mM roztwór w DMSO) inhibitor topoiomerazy typu I (Millipore #208925)
- DMSO (Sigma)

Northern blot

- Bufor H-E 1x - 20 mM HEPES, 1 mM EDTA (pH 7,8)
- SSC 20x - 3 M NaCl, 0,3 M cytrynian sodu
- Bufor hybrydujący - 3,5% SDS, 0,375 M Na₂HPO₄, 0,125 M Na₂HPO₄, 1% roztwór odczynnika blokującego (Roche, 11096176001), 0,1 mg/ml poli[A]

ChIP (ang. *chromatin immunoprecipitation*)

- Bufor lizujący - 72,3 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1x inhibitor proteaz wolny od EDTA
- Bufor sonikacyjny - 1% SDS, 10 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) i 1x inhibitor proteaz wolny od EDTA
- Bufor do rozcieńczeń - 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,01% SDS, 1,1% Triton-X 100, 0,17 M NaCl
- Bufor elucyjny - 1% SDS, 0,1 M NaHCO₃

Profilowanie polisomów

- Bufor do gradientu - 100 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7,6), 5 mM MgCl₂, 100 µg/ml cykloheksymid; 5 µl/ml RNasin i 1x inhibitor proteaz wolny od EDTA

- Bufor lizujący - 10 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 1% Triton[®]X-100, 100 µg/ml cykloheksymid, 100 µg/ml RNasin

FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*)

- Bufor blokujący - 1% BSA w 1x PBS, 200 mM RVC (ang. *ribonucleoside vanadyl complex*)
- Bufor do rozcieńczeń przeciwciał - 1 % BSA w 1x PBS, 40 U/µl RNasin
- Bufor płuczący 1 - 100% formamid, 1M NaPO₄ (pH 7,0), 4x SSC (pH 7,0), 200 mM RVC
- Bufor płuczący 2 - 2x SSC (pH 7,0), 10% Triton[®]X-100
- Bufor płuczący 3 - 1x SSC (pH 7,0), 10% Triton[®]X-100
- Bufor do hybrydyzacji - 100% formamid, 1M NaPO₄ (pH 7,0), 20x SSC (pH 7,0), 50% siarczan dekstranu, 200 mM RVC, 10 µg/µl tRNA E.coli, 1 % BSA w 1 x SSC (pH 7,0), 10 µg/µl DNA ze spermy łososia
- Wysoko wydajny bufor płuczący - 1x SSC (pH 7,0), 100% formamid, 200 mM RVC

Barwienie immunologiczne

- Roztwór blokujący - 1% BSA w 1x PBS

PLA (ang. *proximity ligation assay*)

- PBST – 1x PBS + 0,5% Triton[®]X-100
- Roztwór blokujący - 2% BSA, 2,5 ng/µl DNA spermy łososia (10 µg/µl), 0,05% Tween 20, 1x PBS.

3.4. Startery

NAZWA	SEKWENCJA		OPIS
	FORWARD	REVERSE	
hnRNPUL1-exon2	5'- <u>CAC CGA</u> AAA CGA GTC AGG CTA CGA G - 3'	5'- <u>AAA CCT</u> CGT AGC CTG ACT CGT TTT <u>C</u> - 3'	Oligonukleotydy użyte do wyprowadzenia linii komórkowej HEK UL1 KO z użyciem systemu CRISPR-Cas9. Podkreślono sekwencje miejsc restrykcyjnych, które dodano w celu ligacji z
hnRNPUL1-exon3	5'- <u>CAC CGT</u> ATG AAG AAA ACC GGG GAC G - 3'	5'- <u>AAA CCG</u> TCC CCG GTT TTC TTC ATA <u>C</u> - 3'	

			wektorem PX458 i PX459 z użyciem enzymu <i>BbsI</i> .
hnRNPUL1KO.CC	5'- TCC GAG CTG GAG GGG ACC GC -3'	5'- CCC TCC TAT CCT CTC GGT GC -3'	Startery użyte w reakcji PCR, flankujące region DNA po delecji genu <i>HNRNPUL1</i> (Fig. 4B).
U6-Fwd	5' – GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT CC - 3'	-	Starter użyty do kontroli wklonowania w plazmidzie sekwencji oligonuleotydowej dla sgRNA.
UL1.NheI/NsiI	5' – GCA TCG <i>CTA GCA</i> <u>TGG ACT</u> <u>ACA AAG</u> <u>ACG ATG</u> <u>ACG ACA</u> <u>AGG ATG</u> TGC GCC GTC -3'	5' – ACA GGA <i>TGC</i> ATC TAC TAC TAC TGT GTA CTT GTG CCA -3'	Startery użyte do namnożenia genu <i>HNRNPUL1</i> z metką FLAG w systemie MultiMam. Kursywą zaznaczono sekwencję miejsc restrykcyjnych oraz podkreślono sekwencję metki FLAG.
Starter uniwersalny reverse	-	5' – GTG CAG GGT CCG AGG T - 3'	Startery użyte do syntezy cDNA w oparciu o sprzężoną reakcję odwrotnej transkrypcji.
U1 snRNA	5' – GAT ACC ATG AAG GTG GTT -3'	-	
U6 snRNA	5' – TCG TGA AGC GTT CCA TAT TTT TAA -3'	-	
U7 snRNA	5' – GCT CTT TTA GAA TTT GTC TA - 3'	-	

HIST2H2AC.TOTAL	5' – GCA ACG ACG AGG AAC TGA AC -3'	5' – GGC TTT GTG GCT TTC GGT TT -3'	Startery użyte w reakcji qPCR do analizy poziomu transkryptów genów histonów.
HIST2H2AC.EXTENDED	5' – CGA AAG CCA CAA AGC CAA AAG -3'	5' – GAG CCA CCA AAG TGT CAA ATG -3'	
HIST1H2BC.TOTAL	5' – ATC ACC TCC AGG GAG ATC CA -3'	5' – GAG CCT TTG GGG TTA GGT GT -3'	
HIST1H2BC.EXTENDED	5' – TCC AAG TAA GCG TCT TAA CAC C -3'	5' – CCT CTC CAG TTC CTA TAT TCT A -3'	
HIST1H2BJ.TOTAL	5' – CCG AAA AAG GGC TCC AAG AA -3'	5' – CAC ATA GAT GGA ATA GCT CTC CTT GC -3'	
HIST1H2BJ.EXTENDED	5' – GCT AAG TAA ACA GTG AGT TGG -3'	5' – CAA GTT ACA AGG GTT TGT CAG -3'	
HIST1H3E.TOTAL	5' - CTA TTC ATG CCA AAC GCG TG -3'	5' – GAG CCT TTG GAT TTA AGG TTT G - 3'	
HIST1H3E.EXTENDED	5' – CGC ATT CGT GGG GAG AGG G - 3'	5' – TAC AGC CCT TTT CAC GGA CA -3'	
HIST1H4L.TOTAL	5' – CAG CCA TGG ACG TGG TTT AC - 3'	5' – TGA GAA GGG CCT TTG AGG AAC -3'	
HIST1H4L.EXTENDED	5' – GCG GCT GAG TGT TTT ACT TAC -3'	5' – CTG CCA TAC GTT TAA GTG TTC -3'	

H2AZ.TOTAL	5' – GTG TCA TTC CAC ACA TCC ACA -3'	5' – GGC ATC CTT TAG ACA GTC TTC -3'	
H2AZ.EXTENDED	5' - GAC ATT ATT TCC ACT CTG GTG -3'	5' – GTG CTT AGT TAT TGC TGC TAG -3'	
GAPDH	5' – CTC AAC GAC CAC TTT GTC AAG CTC -3'	5' – TCT TAC TCC TTG GAG GCC ATG T -3'	Normalizatory reakcji qPCR.
RFLNB	5' – TGC CAA TCC CTG TGG TGT T - 3'	5' – CGA GCT GAG CTT ACA GTG CT -3'	
SCARNA2	5' – TGA AAA GCT CTC CTC CTG CG -3'	5' – CTC GAT AAT CAG TGG CCG GG -3'	
FIB	5' – GTG CAT TCC AGT TCC CCC TC - 3'	5' – GAG GGA TGC CTT GAC CCG -3'	Startery użyte w reakcji qPCR do analizy poziomu ekspresji wybranych genów.
RPS6	5' – GCC TTT CTG GGG CAT GGA GC -3'	5' – AAG AAA GCC GGG GTC AAG AG -3'	
RPS15	5' – AGT GTT GCG ATT TGG CGC -3'	5' – CCC GGA CAG GCC TTC CC -3'	
HNRNPUL1	5' – GTG ATG GGC CTA CGC CG -3'	5' – CGT TTC TTG CGG GCA GCA A - 3'	
FUS	5' – GTG GTG GAG GTG GCA GC -3'	5' – CCT ACC CCA TGC CAC CTC T - 3'	
RDNA.PROMOTER	5' - GGT ATA TCT TTC GCT CCG AG -3'	5' - AGC GAC AGG	Startery użyte w reakcji qPCR do analizy

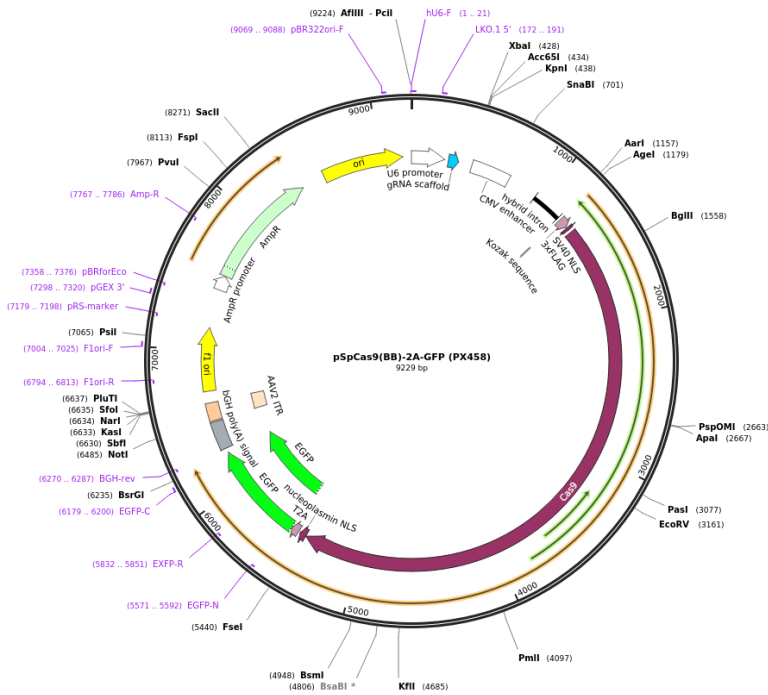
		TCG CCA GAG GA -3'	transkrypcji genów rRNA
IGS	5' - TGG TGG GAT TGG TCT CTC TC - 3'	5' - CAG CCT GCG TAC TGT GAA AA -3'	
RNA5S	5' - CAT ACC ACC CTG ACG CG -3'	5' - CTA CAG CAC CCG GTA TTC CC -3'	
RNA5.8S	5' - ACT CGG CTC GTG CGT C -3'	5' - GCG ACG CTC AGA CAG G - 3'	
RNA18S	5' - GAT GGT AGT CGC CGT GCC -3'	5' - GCC TGC TGC CTT CCT TGG -3'	
RNA28S	5' - AGA GGT AAA CGG GTG GGG TC -3'	5' - GGG GTC GGG AGG AAC GG -3'	
RNA45S	5' - GAA CGG TGG TGT GTC GTT -3'	5' - GCG TCT CGT CTC GTC TCA CT -3'	
RNA47S	5' - GTG CGT GTC AGG CGT TCT -3'	5' - GGG AGA GGA GCA GAC GAG -3'	
ETS	5' - CGG AGG CCC AAC CTC TCC GAC GAC GAC AGG TCG CCA GAG GAC AGC GTG -3'	-	Sondy zastosowane w technice Northern blot (Langhendries i in., 2016). Sondy DNA były oczyszczane metodą HPLC i znakowane przy użyciu zestawu DIG
ITS1	5' - CCT CGC CCT CCG GGC TCC GTT AAT GAT C -3'	-	Oligonucleotide Tailing, zgodnie z protokołem producenta.
ITS2	5' - CTG CGA GGG AAC	-	

	CCC CAG CCG CGC A - 3'		
U7 snRNA	5'-DIG- CTA AAA GAG CTG TAA CAC-3'	-	Sonda użyta w metodzie FISH. Sonda jest znakowana dioksygeniną (DIG) na końcu 5'

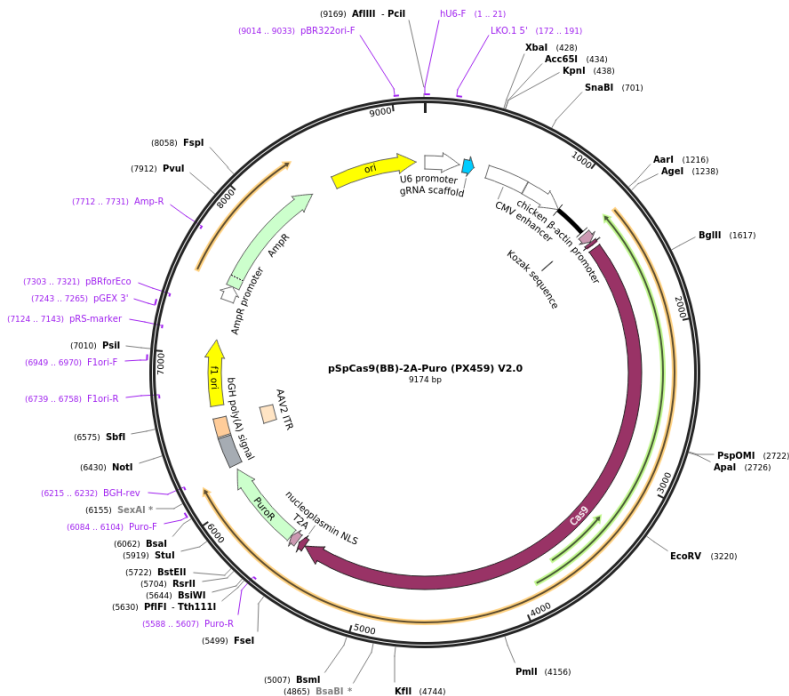
3.5. Wektory genetyczne

Wektory pSpCas9(BB)-2A-GFP - PX458 oraz pSpCas9(BB)-2A-Puro – PX459 użyte w systemie CRISPR-Cas9 zostały zobrazowane, odpowiednio, na schemacie 1 i 2. Wektor pcDNA3 został użyty do wprowadzenia sekwencji kodującej genu białka FUS (rozdział 3.6). Mapę pustego wektora przedstawiono na schemacie 3. W niniejszej pracy doktorskiej użyto również plazmidy kodujące białko FUS z mutacjami P525L i R495X, dostępne w Laboratorium Dojrzwania RNA, Zakładu Ekspresji Genów, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

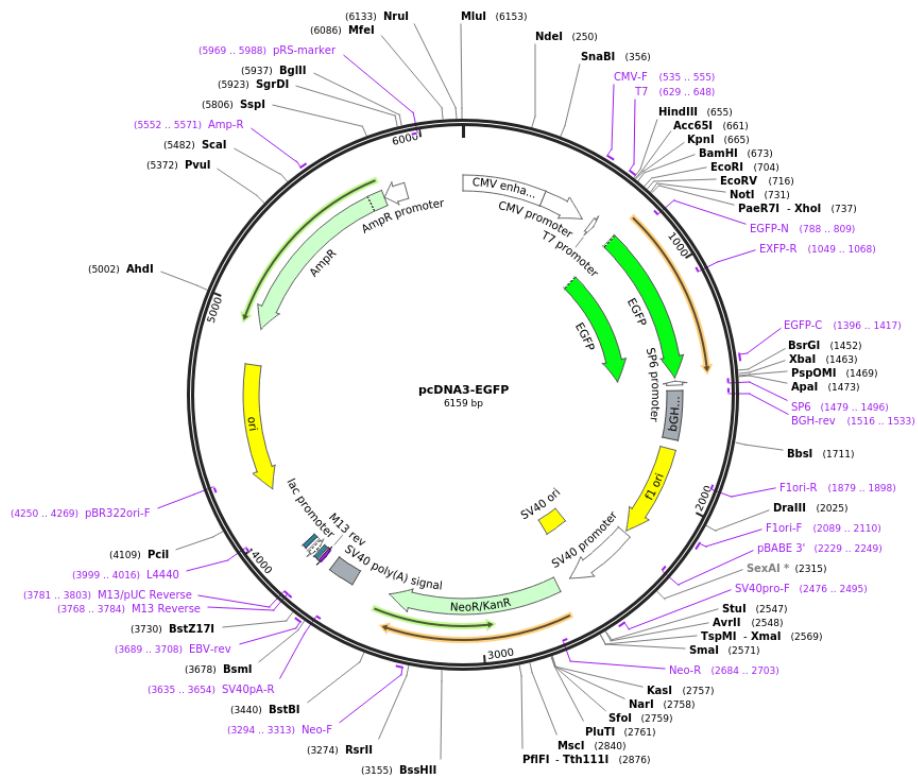
Plazmidy pcDNA3.1 z sekwencją kodującą genu białka hnRNP UL1 z metką HA, typu dzikiego oraz białek z mutacjami R639C oraz R468C, otrzymano od prof. Rogera Grand'a z Institute of Cancer and Genomic Sciences, The Medical School University of Birmingham, England (Pratt, 2015). Plazmidy pcDNA3.1 z sekwencją kodującą białka hnRNP UL1 typu dzikiego (UL1.WT) oraz białka z mutacjami aminokwasowymi, w których arginina została zastąpiona lizyną w motywie RGG/RG (UL1.RK), otrzymano od prof. Stéphana Richard'a z Terry Fox Molecular Oncology Group and Segal Cancer Center, Bloomfield Center for Research on Aging, Lady Davis Institute for Medical Research and Departments of Oncology and Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada (Gurunathan i in., 2015).



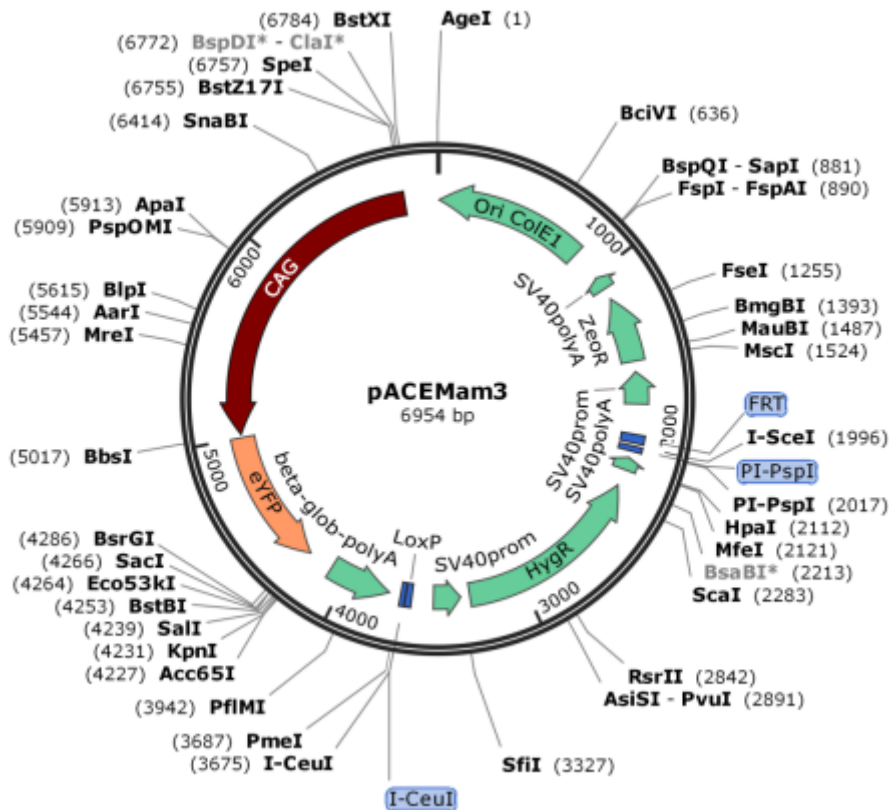
Schemat 1. Mapa plazmidu PX458 - pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene #48138). Obecna sekwencja nukleazy Cas9 z *Streptococcus pyogenes* wraz z 2A-EGFP oraz szkielet do wklonowania sgRNA.



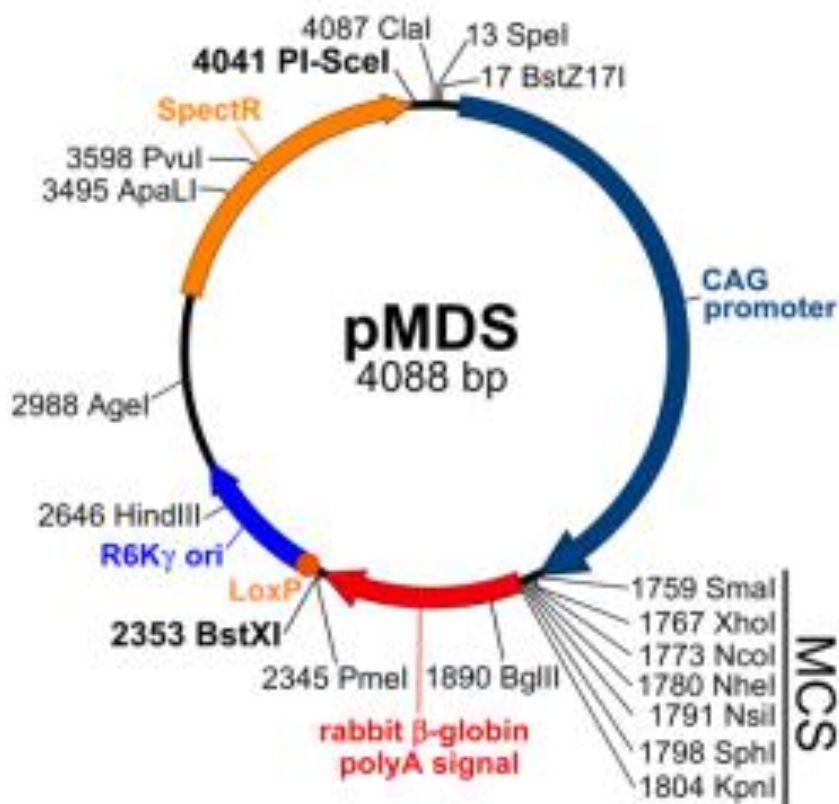
Schemat 2. Mapa plazmidu PX459 - pSpCas9(BB)-2A-Puro (Addgene # 62988). Obecna sekwencja nukleazy Cas9 z *S. pyogenes* wraz z 2A-Puromycyną oraz szkielet do wklonowania sgRNA.



Schemat 3. Mapa plazmidu pcDNA3.1 (Addgene #13031).



Schemat 4. Mapa plazmidu pACEMam3 użytego w systemie MultiMam™ Stable.



Schemat 5. Mapa plazmidu pMDS użytego w systemie MultiMam™ Stable.

3.6. Konstrukty genetyczne do ekspresji białek hnRNP UL1 i FUS

NAZWA	DŁUGOŚĆ SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ	OPIS	PLAZMID
UL1.WT	856 AA	pełna sekwencja białka hnRNP UL1	pcDNA3.1
UL1.RK	856 AA	arginina zastąpiona lizyną w motywie RGG/RG	pcDNA3.1
FUS WT	527 AA	pełna sekwencja białka FUS	pcDNA3
FUS ΔNT	362 AA	sekwencja pozbawiona N-końca białka	pcDNA3
FUS ΔGly	407 AA	sekwencja pozbawiona regionu bogatego w glicynę	pcDNA3
FUS ΔRRM	441 AA	sekwencja pozbawiona domeny RRM	pcDNA3

FUS ΔCT	372 AA	sekwencja pozbawiona C- końca białka	pcDNA3
FUS ZFM	527 AA	mutacje punktowe w sekwencji domeny palca cynkowego	pcDNA3

3.7. Przeciwciała

NAZWA	ROZCIĘCZENIE	FIRMA
Przeciwciała I-rzędowe		
anty-hnRNP UL1	1:5000 1:200	Abcam (#ab68480), Santa Cruz Biotechnology (#sc-393434)
anty-FLAG	1:1000	Sigma (#A8592)
anty-HA	1:200	Abcam (#ab9110)
anty-Aktyna	1:50 000	MP (#691001)
anty-Fibrylaryna	1:2000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-25397)
anty-Nukleolina	1:1000	Abcam (#ab22758)
anty-FUS	1:2000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-47711)
anty-γH2A.X	1:500 1:200	Santa Cruz Biotechnology (#sc-517348)
anty-RPS6	1:5000	Abcam (#ab70227)
anty-RPS15	1:1000	Antikoerper (#ABIN2786563)
anty-RPA32	1:6000 1:200	Bethyl Laboratories (#A300- 245A)
anty-pChk1	1:1000	Cell Signaling Technology (#2341)
anty-XRCC1	1:200	Invitrogen (#MA5-13412)
anty-53BP1	1:200	Abcam (#ab175933)
anty-Rad50	1:200	Abcam (#ab124682)
anty-BXDC2/BRIX1	1:500 1:200	Santa Cruz Biotechnology (#sc-373680)
anty-RPS3A	1:500	Novus Biologicals (#NBP1- 31598)
anty-RBM28	1:1000	Abcam (#ab150800)
anty-SRP14	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-377012)
anty-RRP1B	1:500	Novus Biologicals (#NBP1- 81533)
anty-NUFIP2	1:800	Proteintech (#17752-1-AP)
anty-RPA194	1:500	Santa Cruz Biotechnology (#sc-46699)
mysie IgG	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (#sc-2025)

anty-digoxygenin-AP fragmenty Fab	1:1000	Roche (#11093274910)
Przeciwciała II-rzędowe		
kozie anty-królicze IgG- peroksydaza chrzanowa (HRP)	1:2900	Santa Cruz Biotechnologies (#SC-2004)
kozie anty-mysie IgG- peroksydaza chrzanowa (HRP)	1:2900	Santa Cruz Biotechnologies (#SC-516102)
królicze anty-mysie Alexa Fluor 555	1:200	Thermo Fisher Scientific (#A21422)
królicze anty-mysie Alexa Fluor 488	1:200	Thermo Fisher Scientific (#A32723)
kozie anty-królicze Alexa Fluor 555	1:200	Thermo Fisher Scientific (#A32732)
kozie anty-królicze Alexa Fluor 488	1:200	Thermo Fisher Scientific (#A32731)

3.8. Zestawy gotowych odczynników i ich zastosowanie

- MultiMamTM Stable (Geneva Biotech) - wygenerowanie stabilnej linii komórkowej z nadekspresją białka hnRNP UL1.
- Directol-zolTM RNA MiniPrep (Zymo Research) – izolacja RNA.
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) - izolacja DNA plazmidowego.
- CloneAmpTM HiFi PCR Premix (Clontech Laboratories) – nastawienie reakcji PCR.
- GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) - oczyszczanie produktów PCR oraz elucja DNA z żelu agarozowego.
- EXTRACTME[®] Genomic DNA (Blirt) – zestaw do izolacji DNA genomowego (gDNA).
- Lipofectamine[®]2000 Reagent (Invitrogen), Viromer[®]RED (Sti) lub XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) - transfekcja kwasów nukleinowych do komórek eukariotycznych.
- Comet Assay Kit (3-well slides) (Abcam) – pomiar uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach.
- Phos-tagTM SDS-PAGE (Wako) - oddzielenie form fosforylowanych i niefosforylowanych białka.
- PowerSYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) – nastawienie reakcji qPCR.

- μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kits (MACS Molecular) – immunoprecypitacja na kulkach magnetycznych.
- ProLong™ Gold (Thermo Scientific) – analizy mikroskopowe.
- CORALL Total RNA-Seq Library Preparation Kit (Lexogen) – przygotowanie bibliotek RNA.
- Agilent RNA 6000 Nano, Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent) oraz Qubit™. dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) – ocena jakościowa i ilościowa bibliotek RNA.
- DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Roche) – zestaw do znakowania sond.

3.9. Mikroskopy

- Mikroskop fluorescencyjny:

Nikon ECLIPSE TE 2000-U

System mikroskopii fluorescencyjnej: X-CITE SERIES 120PC

- Mikroskopy konfokalne:

Olympus Fluoview 1200 IX83,

Zeiss LSM 510

Mikroskop odwrócony: Zeiss Axiovert 200

Kamera UV: Zeiss AxioCam HRC

4. Metody

4.1. Techniki pracy z komórkami ludzkimi typu adherentnego

Wszystkie prace i eksperymenty z wykorzystaniem komórek ludzkich były przeprowadzane w komorze laminarnej z horyzontalnym przepływem powietrza przez filtry HEPA oraz przy użyciu sterylnego sprzętu laboratoryjnego jednorazowego użytku. Przed rozpoczęciem pracy, odczynniki były ogrzewane w łaźni wodnej do temperatury 37°C. Linie komórkowe regularnie sprawdzano pod kątem zakażenia mykoplazmą (standardowa procedura w Laboratorium Dojrzewania RNA) i tylko niezainfekowane komórki używano do eksperymentów.

4.1.1 Rozmrożenie linii komórkowych

1. W celu rozmrożenia, krioprobówki z zamrożonymi komórkami umieszczano w łaźni wodnej na 1-2 minuty.
2. Rozmrożone komórki przenoszono do 15 ml falkonu i uzupełniano suplementowaną pożywką DMEM do 5 ml. Następnie wirowano przez 5 min przy prędkości 200 g.
3. Po wirowaniu, ssakiem odciągano supernatant, a osad komórkowy zawieszano w 5 ml suplementowanej pożywki DMEM oraz przenoszono całość do buteleczki hodowlanej T-25 (powierzchnia 25 cm²).
4. Buteleczkę umieszczano w inkubatorze, gdzie panowały optymalne warunki do hodowli i wzrostu komórek: temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%, wilgotność 95%.

4.1.2 Pasaż i hodowla komórek

Hodowle komórkowe były prowadzone w specjalnych naczyniach hodowlanych typu buteleczki lub szalki, w obecności suplementowanej pożywki DMEM. Komórki pasażowano średnio co 2-3 dzień, gdy poziom konfluencji wynosił 90-100%. Komórki, których liczba pasażu przekraczała wartość 15, były utylizowane.

1. Z naczynia hodowlanego usuwano pożywkę DMEM.
2. Komórki przemywano 1x stężonym buforem PBS.
3. Dodawano trypsynę w ilości 10% objętości naczynia, rozprowadzając ją po komórkach i umieszczając naczynie hodowlane w inkubatorze na około 3 minuty.
4. Stopień odklejenia komórek od podłoża określano przy pomocy mikroskopu świetlnego.

5. Gdy wszystkie komórki były zawieszane w trypsynie, dodawano suplementowaną pożywkę DMEM do objętości pierwotnej hodowli.
6. 1/10 objętości hodowli z poprzedniego pasażu przenoszono do nowego naczynia hodowlanego i uzupełniano do końcowej objętości suplementowaną pożywką DMEM.
7. Naczynie umieszczano w inkubatorze, gdzie prowadzono dalszą hodowlę.

Niektóre eksperymenty wymagały posiadania określonej ilości komórek, w tym celu po trypsynizacji (etap 5) komórki zliczano za pomocą automatycznego licznika komórek Countess II (Invitrogen). Najpierw, do próbki dodawano 15 μ l mieszaniny komórkowej i mieszano przez pipetownie w stosunku 1:1 z barwnikiem trypan blue, następnie 10 μ l mieszaniny podawano na płytkę do liczenia i umieszczano w aparacie Countess II, gdzie mierzono liczbę żywych komórek w 1 ml. Potrzebną objętość do eksperymentów przenoszono do odpowiedniego naczynia hodowlanego i uzupełniano do końcowej objętości suplementowaną pożywką DMEM.

4.1.3 Zamrażanie komórek

1. Usuwno pożywkę DMEM znad komórek.
2. Przepłukiwano jedną objętością 1x stężonego PBS, a następnie usuwno znad komórek.
3. Dodawano 10% objętości trypsyny i rozprowadzano po komórkach, po czym umieszczano w inkubatorze na około 3 minuty.
4. Następnie uzupełniano do objętości buteleczki suplementowaną pożywką DMEM i przenoszono całość do falkonu.
5. Falkon wirowano z prędkością 200 g przez 5 minut.
6. Usuwno pożywkę znad osadu komórkowego, zawieszano osad w 1 objętości 1x stężonego PBS.
7. Ponownie wirowano z prędkością 200 g przez 5 minut.
8. Usuwno PBS znad osadu komórkowego.
9. Osad rozpuszczano w niekompletnym DMEM, tak aby liczba komórek nie przekraczała ok. 300 tys. w 1 ml krioprobówce.
10. Komórki rozcieńczone w DMEM przenoszono po 400 μ l do krioprobówek, tworząc kilka alikwot, następnie dodawano 500 μ l FBS i 100 μ l DMSO.

11. Krioprobówki umieszczano w mroźnicy z izopropanolem, gdzie komórki są zamrażane z prędkością $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
12. Mroźnica umieszczano w zamrażarce (-80°C) na całą noc. Następnego dnia przenoszono krioprobówki do dewara z ciekłym azotem, gdzie mogły być przechowywane przez dłuższy czas.

4.1.4 Wyprowadzenie linii komórkowej z wyciszeniem genu *HNRNPUL1*

Do stworzenia linii komórkowej HEK 293T typu knockout z wyciszeniem genu *HNRNPUL1* (HEK UL1 KO) wykorzystano system CRISPR-Cas9 oparty na wydajnej edycji genomu przez nukleazę Cas9, zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem opisanym przez Ran i in., 2013.

1. Za pomocą narzędzia „CRISPR Design Tool” (<https://zlab.bio/guide-design-resources>) zaprojektowano oligonukleotydy dla sgRNA (ang. *short guide RNA*), komplementarne do sekwencji docelowej genomowego DNA (rozdział 3.4.). sgRNA kieruje nukleazę Cas9 do miejsca przecięcia w genomie, dlatego musi być komplementarna do 20-nukleotydowej sekwencji docelowej (sekwencja protospacer) w genomowym DNA, a po niej musi następować sekwencja PAM (ang. *protospacer adjacent motif*) NGG, gdzie N- to dowolny nukleotyd (Fig. 4A). Sekwencja PAM jest niezbędna do przecięcia DNA.
2. Wklonowanie oligonukleotydów sgRNA do wektora PX458 (SpCas9-2A-EGFP, Addgene #48138) i PX459 (SpCas9-2A-Puro, Addgene #62988) za pomocą enzymu restrykcyjnego *BbsI*, w celu koekspresji z Cas9. Na początku trawiono wektory według poniższego schematu.

Reakcja trawienia:

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Wektor PX458 lub PX459	1 μg
Bufor FastDigest (10x)	1x
FastDigest <i>BbsI</i>	10 U

Próbę inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Następnie, enzym restrykcyjny inaktywowano termicznie przez 20 minut w 65°C i oczyszczono zlinearyzowany plazmid na kolumnach z użyciem kitu GeneJET Genomic DNA Purification.

Następnie przygotowano oligonukleotydy sgRNA do wklonowania do wektorów PX458 i PX459. W tym celu sporządzono następującą mieszaninę do fosforylacji i hybrydyzacji oligonukleotydów sgRNA (dla każdej pary):

SKŁAD	STĘŻENIE KOŃCOWE
Oligonukleotyd 1	10 μ M
Oligonukleotyd 2	10 μ M
Bufor T4 DNA Ligaza (10x)	1x
T4 PNK	5 U

Reakcję prowadzono w termocyklerze przy następujących parametrach: 37 °C przez 30 min.; 95 °C przez 5 min.; schłodzenie termocyklera do 25°C z szybkością 5°C/min. Następnie, dupleks fosforylowanych oligonukleotydów rozcieńczono z H₂O w stosunku 1:200.

Przygotowano reakcję ligacji:

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Wektor PX458 lub PX459 po trawieniu	100 ng
Mieszanina oligonukleotydów (rozcieńczenie 1:200)	20 μ M
Ligaza T4	5 U
Bufor do ligazy DNA T4 (10x)	1x

Mieszaninę ligacyjną inkubowano przez całą noc w 4°C. Następnie, przeprowadzono transformację kompetentnych komórek bakteryjnych *Escherichia coli* metodą szoku cieplnego (ang. *heat shock*), opisaną w rozdziale 4.2.1. Do transformacji użyto 10 μ l mieszaniny ligacyjnej. Po transformacji, komórki bakteryjne wysiano na szalki Petriego ze stałą pożywką LB i 100 μ g/ml ampicyliny. Szalki inkubowano całą noc w 37°C. Następnego dnia zaszczerpiono kilka kolonii z każdej płytki do 3 ml płynnej pożywki LB z 100 μ g/ml ampicyliny i ponownie inkubowano w 37°C przez całą noc. Kolejnego dnia plazmidy wyizolowano kitem GeneJET Plasmid Miniprep Kit i wysłano do sekwencjonowania ze starterem U6-Fwd, w celu sprawdzenia, czy sekwencja oligonukleotydoma jest prawidłowo umieszczona poniżej promotora U6. Następnie, wysiano komórki HEK 293T na płytkach 24-dołkowych w ilości 1,3 x 10⁵ komórek/dołek, w pożywce DMEM bez antybiotyków. W dniu przeprowadzenia kotransfekcji konfluencja komórek wynosiła około 80%. Kotransfekcję przeprowadzono za pomocą odczynnika Lipofectamina®2000 (rozdział 4.1.6). Plazmidy zmieszano w różnych proporcjach, aby ich ilość łącznie wynosiła 500 ng. Po 24-godzinach przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego sprawdzono, czy komórki są widoczne (plazmid PX458 zawiera białko

fluorescencyjne EGFP), po czym przepasażowano je na 10 cm szalki. Następnego dnia rozpoczęto selekcję puromycyną, stosując stężenie 2 µg/ml. Selekcja trwała 20 dni. Po selekcji komórki zbierano, a następnie rozcieńczano do pojedynczych komórek i posiewano na płytki 96-dołkowe. Wzrost komórek trwał 2-3 tygodnie, następnie pasażowano je najpierw na płytki 24-dołkowe, i kolejno na płytki 6-dołkowe. Przy konfluencji bliskiej 100% zbierano komórki, połowę z nich przeznaczono do długotrwałego przechowywania, a drugą połowę wykorzystywano do dalszych analiz.

3. Wyciszenie genu *HNRNPUL1* i brak ekspresji białka hnRNP UL1 potwierdzono poprzez genotypowanie, metodą western blot połączoną z immunodetekcją oraz techniką immunofluorescencji (Fig. 4).

4.1.5 Wyprowadzenie linii komórkowej ze stabilną nadekspresją białka hnRNP UL1

W celu przygotowania linii komórkowej HEK 293 ze stabilną nadekspresją białka hnRNP UL1 (HEK UL1 OE), użyto zestawu MultiMam™ Stable z firmy Geneva Biotech i postępowano zgodnie z dołączonym protokołem.

1. Sekwencję kodującą *HNRNPUL1* namnożono w reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów (rozdział 3.4.) i polimerazy CloneAmp™ HiFi (rozdział 4.4.2), następnie plazmid pMDS i produkt PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi *NheI* i *NsiI*, defosforylowano (rozdział 4.4.5 i 4.4.6) oraz oczyszczano (rozdział 4.4.4). Gotowy produkt wklonowano w miejsce MCS (ang. *multiple cloning sites*) plazmidu pMDS, przy użyciu standardowych procedur klonowania (rozdział 4.4.7). Mieszaninę ligacyjną dodano do komórek *E. coli* posiadających gen *pir* (*pirHC*) i posiewano na zestaloną pożywkę LB zawierającą spektynomycynę (50 µg/ml).
2. Połączono ze sobą 1 µg plazmidu pMDS (zawierającego sekwencję kodującą gen *HNRNPUL1*) z 1 µg plazmidu pACEMam3 (docelowy plazmid do nadekspresji), uzupełniono wodą do 16 µl oraz dodano 2 µl 10x buforu Cre i 1-2 µl rekombinazy Cre (1-2U).
3. Reakcję inkubowano w 37°C przez godzinę.
4. 10-15 µl reakcji zmieszano ze 100 µl komórek kompetentnych. Mieszaninę inkubowano na lodzie przez 15-30 minut. Następnie wykonano transformację metodą *heat shock*, opisaną w rozdziale 4.2.1.

5. 400 μ l pożywki LB dodano do zawiesiny komórek bezpośrednio po transformacji.
6. Zawiesinę inkubowano przez całą noc w inkubatorze z wytrząsaniem w 37°C.
7. 50 μ l zawiesiny komórkowej wysiano na płytki ze stałą pożywką LB i antybiotykiem selekcyjnym spektynomycyną (50 μ g/ μ l).
8. Inkubowano przez całą noc w 37°C.
9. Kolonie bakteryjne weryfikowano za pomocą reakcji PCR kolonijny (rozdział 4.2.4), produkty reakcji sprawdzano na żelu agarozowym.
10. Transformanty zawierające plazmid przenoszono do 3 ml pożywki LB z antybiotykiem spektynomycyną (50 μ g/ μ l).
11. Inkubowano w inkubatorze z wytrząsaniem w 37°C przez całą noc.
12. Całonocne hodowle komórkowe odwirowywano przy prędkości 4000 g przez 5-10 minut. plazmid Oczyszczono za pomocą zestawu gotowych odczynników GeneJET Plasmid Miniprep, zgodnie z zaleceniami producenta.
13. Stężenia oczyszczonych plazmidów mierzono za pomocą spektrofotometrii absorpcyjnej UV.
14. Oczyszczony plazmid trawiono w następujący sposób:

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor rCutSmart (10x)	1x
DNA	1 μ g
Enzym <i>I-SceI</i>	10 U

Próby inkubowano przez godzinę w 37°C i inaktywowano przez 20 min. w 65°C.

15. Posiano 1x 10⁶ komórek HEK 293 Flp-In T-rex na buteleczki T-25 w pożywce DMEM z 10% FBS, bez antybiotyków.
16. Po 24 godzinach od wysiana, komórki transfekowano przy użyciu następującej mieszanki plazmidów: 9 μ g pOG44 (plazmid niezbędny, aby przeprowadzić transfekcję w komórkach HEK 293 Flp-IN T-rex) i 1 μ g pACEMam3/pMDS.
17. Zmieszano 10 μ l Lipofectaminy[®]2000 z 500 μ l OPTI-MEM.
18. Zmieszano 10 μ g DNA plazmidów z 500 μ l OPTI-MEM.
19. Po 5 min. inkubacji połączono zawartość probówek z punktu 17. i 18.
20. Po 20 min. inkubacji dodano mieszaninę do komórek.
21. Komórki inkubowano przez 24 godziny w pożywce OPTI-MEM, następnie wymieniono pożywkę na selektywną: suplementowaną pożywkę DMEM z hygromycyną (100 μ g/ml) i zeocyną (50 μ g/ml). Pożywkę zmieniano co 4 dni na suplementowaną pożywkę DMEM z antybiotykami selekcyjnymi.

22. W celu identyfikacji pozytywnych komórek rozwijające się kolonie wykazujące ekspresję eYFP z plazmidu pACEMam3/pMDS oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym.
23. Po 2-3 tygodniach, metodą rozcieńczeń do pojedynczej komórki przepasażowano komórki na 96-dółkowe płytki. Gdy z pojedynczej komórki powstawała kolonia pasażowano ją na płytkę 6-dółkową. Po osiągnięciu konfluencji bliskiej 100% materiał zbierano do dalszych analiz oraz w celu zamrożenia komórek do długotrwałego przechowywania.

4.1.6 Transfekcja przejściowa komórek ludzkich

- **Odczynnikiem X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent**

1. Dzień przed transfekcją posiewano 500 000 komórek do buteleczki T-25.
2. Bezpośrednio przed transfekcją wymieniono pożywkę DMEM na świeżą.
3. Do probówki typu Eppendorf dodawano 6 µg plazmidu i uzupełniano do objętości 600 µl pożywką OPTI-MEM. W drugiej probówce mieszano 6 µl odczynnika X-tremeGENE DNA oraz 591,5 µl pożywki OPTI-MEM. Następnie, zawartość obu próbek łączono i inkubowano 30 min. w temperaturze pokojowej.
4. Po inkubacji, kompleks transfekcyjny podawano kropelkowo bezpośrednio na komórki.
5. Komórki zbierano po 48 godzinach.

- **Odczynnikiem Viomer[®]RED**

1. Kroki 1 i 2 są identyczne, jak w przypadku odczynnika X-tremeGENE DNA (rozdział 4.1.6)
2. Do probówki dodawano 5 µg plazmidu i uzupełniano buforem Viomer[®]RED do 540 µl.
3. Do drugiej probówki dodawano na ściankę 2,4 µl odczynnika Viomer[®]RED oraz 57,6 µl buforu Viomer[®]RED.
4. Zawartość probówki zawierającej plazmid przenoszono do probówki zawierającej mix odczynnika Viomer[®]RED z buforem.
5. Kompleks transfekcyjny inkubowano przez 15 min. w temperaturze pokojowej.

6. Następnie, kompleks transfekcyjny dodawano kropelkowo bezpośrednio na komórki.
7. Komórki zbierano po 48 godzinach.

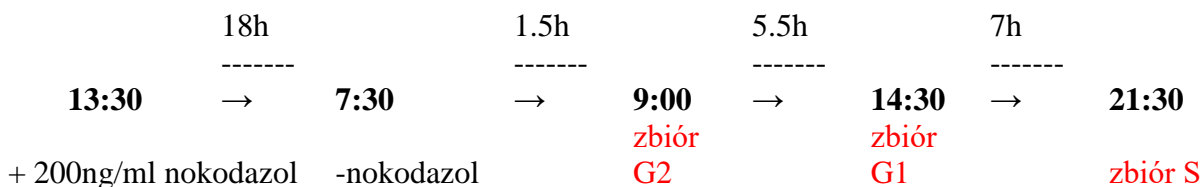
- **Odczynnikiem Lipofectamine®2000**

1. Dzień przed transfekcją na dołek w płytce 24-dołkowej posiewano 130 000 komórek.
2. W probówce rozcieńczano 2 µl odczynnika do transfekcji w 50 µl pożywki OPTI-MEM.
3. W drugiej probówce rozcieńczano 5 µg plazmidu w 250 µl pożywki OPTI-MEM.
4. Następnie, rozcieńczone DNA dodawano do rozcieńczonego odczynnika w stosunku 1:1 i inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej.
5. Po inkubacji, mieszaninę transfekcyjną dodawano kropelkowo po 50 µl na dołek.
6. Komórki zbierano po 48 godzinach.

4.1.7 Synchronizacja komórek

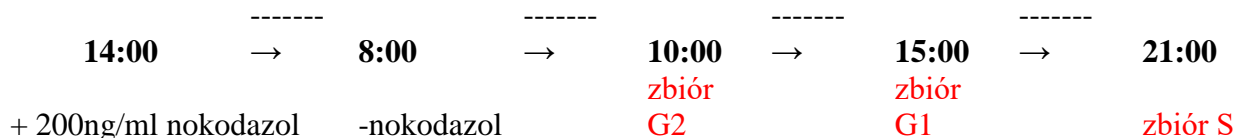
Do synchronizacji używano odczynnika nokodazol podawanego do pożywki DMEM w stężeniu 200 ng/ml. Nokodazol zatrzymuje komórki na pograniczu faz G2/mitoza cyklu komórkowego. Po 18 godzinach inkubacji z nokodazolem, komórki były uwalniane przez zmianę pożywki na świeżą i kontynuowały swój wzrost. Komórki zbierano następnie w odpowiednich punktach czasowych. Schemat postępowania zoptymalizowany dla komórek HEK 293T oraz HEK UL1 KO przedstawiono poniżej. Wydajność synchronizacji sprawdzano na cytometrze przepływowym Guava easyCyte™ HT System.

- HEK 293T



- HEK UL1 KO

18h	2h	5h	6h
-----	----	----	----



Komórki HeLa WT synchronizowano stosując podwójny blok tymidyna/mimozyna. Najpierw dodawano do pożywki tymidynę w stężeniu 2 mM, która zatrzymywała komórki na pograniczu faz G1/S. Po 17 godzinach inkubacji, pożywkę z tymidyną zamieniano na świeżą suplementowaną pożywkę DMEM. Po kolejnych 12 godzinach dodawano mimozynę w stężeniu 400 μ M, która blokowała komórki w fazie G1 cyklu komórkowego. Po 14 godzinach inkubacji z mimozyną komórki uwalniano z bloku i zbierano, odpowiednio, po 1 godzinie zsynchronizowane do fazy G1, po 5 godzinach zsynchronizowane do fazy S i po 9 godzinach zsynchronizowane do fazy G2.

4.1.8 Izolacja jąderek

Izolację jąderek komórkowych przeprowadzano na podstawie protokołu opisanego przez Li i Lam, 2015.

1. Komórki wysiewano na szalki Petriego o średnicy 10 cm w suplementowanej pożywce DMEM i hodowano do czasu osiągnięcia przez komórki 90% konfluencji.
2. Godzinę przed rozpoczęciem izolacji, zmieniono pożywkę DMEM na świeżą. Bufor SI i SII schładzano w -20°C (rozdział 3.3.).
3. Pożywkę DMEM usuwano znad komórek i natychmiast dodawano 30 ml schłodzonego buforu SI. W trakcie dodawania, przepłukiwano komórki przyklejone do podłoża szalki, a następnie usuwano bufor SI.
4. Szalki umieszczano na lodzie, komórki zbierano za pomocą skrobaczki i przenoszono do 1,5 ml probówek typu eppendorf. Następnie, uzupełniano schłodzonym buforem SI do objętości 500 μ l.
5. Probówki z komórkami umieszczano w sonikatorze z komorą chłodzącą i poddawano sonikacji przy 50% mocy przez 5 cykli: 10 sekund włączone, 10 sekund wyłączone.
6. Po sonikacji, pod otrzymaną zawiesinę komórek podkładano 700 μ l schłodzonego buforu SII (rozdział 3.3.).
7. Następnie, wirowano przez 5 minut przy prędkości 1800 g w temperaturze 4°C .

8. Osad uzyskany po wirowaniu zawierał wyizolowane jąderka (NO). Supernatant, który zawierał frakcję jądrowo-cytoplazmatyczną (CN), ostrożnie przenoszono nad osadu do nowych probówek.
9. W celu uzyskania jąderek o większej czystości, osad ponownie zawieszano w 500 μ l schłodzonego buforu SI i powtarzano kroki 6-8.
10. Czystość i jakość wyizolowanej frakcji NO i CN sprawdzono metodą western blot połączoną z immunodetekcją z użyciem przeciwciał rozpoznających specyficzne dla danej frakcji markery (Fig. 6).

4.1.9 Indukcja uszkodzeń DNA w komórkach ludzkich

- Do eksperymentu immunofluorescencji, komórki inkubowano z 10 μ M ETO, 5 μ M CPT i DMSO o stężeniu odpowiednio 10 μ M i 5 μ M (jako kontrolą) przez 2,5 godziny.
- W przypadku testu z trypanem blue (Levone i in., 2021), komórki poddawano działaniu 0,5 μ M ETO lub 0,1 μ M CPT. Następnie, komórki zbierano po 18, 24, 30, 48, 72 i 80 godzinach i rozcieńczano w stosunku 1:1 z odczynnikiem trypan blue. Żywe komórki liczono za pomocą licznika komórek.
- Do testu kometowego, komórki poddawano działaniu 20 μ M ETO i 10 μ M CPT przez 2,5 godziny, a dalej postępowano według protokołu dołączonego do zestawu Comet Assay. Obrazy uzyskano przy użyciu konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus Fluoview 1200 IX83 z filtrem FITC. Do analizy wyników wykorzystano oprogramowanie CASPlab. Analizowano dwa parametry: %DNA ogona i moment ogona. %DNA ogona obliczano w następujący sposób: %DNA ogona = 100 x intensywność DNA ogona/intensywność DNA komórki. Moment ogona był mierzony jako Olive Tail Moment (OTM): $OTM = \% \text{ DNA ogona} \times \text{długość momentu ogona}$. Dla każdej próby analizowano 50 komórek.

4.2. Techniki pracy z komórkami bakteryjnymi *Escherichia coli*

Bakterie były hodowane na stałej bądź płynnej sterylnej pożywce Luria-Bertani, o składzie: Bio-Trypton (Bioshop) 1 g/100 ml, ekstrakt drożdżowy (Bioshop) 0,5 g/100 ml, NaCl (Sigma-Aldrich) 1 g/100 ml. W przypadku pożywki, stałej LB do wyżej

wymienionych składników dodawano również agar (Bioshop) 1,5 g/100 ml. Pożywki selekcyjne zawierały dodatkowo antybiotyk, ampicylinę lub kanamycynę (Bioshop), o stężeniu końcowym 0,05 µg/ml.

4.2.1 Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* metodą szoku cieplnego (ang. *heat shock*)

1. Komórki kompetentne przechowywane w -80°C umieszczono na lodzie i rozmrażano przez około 20 minut.
2. 10 µl mieszaniny ligacyjnej (rozdział 4.4.7) dodawano do zawiesiny bakterii i inkubowano na lodzie przez kolejne 20 minut.
3. Następnie, próbki umieszczano w termomikserze na 2 minuty w 42°C, poddając je szokowi cieplnemu.
4. Kolejno, próbki umieszczano na lodzie na 3 minuty.
5. Następnie, do komórek dodawano 600 µl płynnej pożywki LB, umieszczano próbki w termomikserze i inkubowano przez 2 godziny w 37°C z wytrząsaniem 350 rpm.
6. Probówki wirowano przy prędkości 600 g przez 3 minuty.
7. Znad osadu odpipetowywano 550 µl pożywki, a w pozostałej części zawieszano osad bakteryjny.

4.2.2 Posiew kultury bakterii na pożywkę stałą i płynną LB

1. Bakterie posiewano z zachowaniem i przestrzeganiem zasad sterylnej pracy z bakteriami: przy zapalonym palniku i pod dygestorium. 50 µl zawiesiny bakteryjnej po transformacji wysiewano na szalkę ze stałą pożywką LB z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym (rozdział 3.2.), rozprowadzając kulturę bakteryjną szklaną głaszczką.
2. Szalki inkubowano przez całą noc w 37°C.
3. Kolonie bakteryjne, które wyrosły, pobierano z szalki za pomocą sterylnej końcówki i umieszczano w falkonie zawierającym płynną pożywkę LB z antybiotykiem selekcyjnym.
4. Falkony z pożywką LB i bakteriami inkubowano przez całą noc w 37°C z wytrząsaniem.

4.2.3 Izolacja plazmidów

Po całkowitej inkubacji, bakterie wirowano przez 5 minut przy prędkości 600 g. Po wirowaniu supernatant usuwano, a z osadu bakteryjnego izolowano plazmidowy DNA za pomocą zestawu gotowych odczynników GeneJET Plasmid Miniprep, zgodnie z zaleceniami producenta.

4.2.4 PCR kolonijny

Na początku przygotowywano matrycę, w tym celu dodawano na płytkę 96-dółkową po 20 μl płynnej pożywki LB. Kolejno, sterylną końcówką przenoszono pojedyncze kolonie bakteryjne z szalki po całkowitej inkubacji i umieszczano w dołkach na płytce. Następnie przygotowano mieszaninę reakcyjną:

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor Dream Taq (10x)	1x
Starter Forward (10 μM)	0,5 μM
Starter Reverse (10 μM)	0,5 μM
dNTP (10 mM)	0,2 mM
Polimeraza Dream Taq (5 U/ μl)	2,5 U
Matryca	3 μl

Po czym nastawiono reakcję PCR z przygotowanymi próbkami, według warunków opisanych poniżej:

ETAPY	TEMPERATURA [°C]	CZAS
Denaturacja wstępna	95	10 min.
Amplifikacja 26 cykli	Denaturacja	30 sek.
	Hybrydyzacja	30 sek.
	Elongacja	1 min./1 kb
Elongacja końcowa	72	10 min.
Schłodzenie	4	∞

Wynik reakcji PCR analizowano w żelu agarozowym i wybierano odpowiednie kolonie do dalszych analiz.

4.3. Techniki pracy z RNA

4.3.1 Izolacja RNA

Izolację RNA i/lub trawienie DNA z udziałem DNazy przeprowadzano z użyciem gotowego zestawu odczynników Directol-zolTM RNA MiniPrep zgodnie z zaleceniami producenta.

4.3.2 Elektroforeza RNA

Elektroforezę RNA prowadzono w 1% żelu agarozowym:

1. 0,5 g agarozy rozpuszczano w 50 ml buforu 1x TBE przez podgrzanie roztworu.
2. Roztwór przestudzano i dodawano 2,5 µl bromku etydyny o stężeniu 10 mg/ml.
3. Przygotowywano 0,5 µg RNA zawieszono w 2x stężonym buforze obciążającym do RNA (rozdział 3.3.).
4. Przed nałożeniem na żel, RNA denaturowano przez 5 minut w 65°C.
5. Elektroforezę prowadzono przez 30 minut w buforze 1x TBE przy natężeniu 55 mA, napięciu 200 V.

4.3.3 Synteza cDNA

- **Z wykorzystaniem oligo(dT)₁₈ lub losowych heksamerów**

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
oligo(dT) ₁₈ lub losowe heksamery	250 ng
RNA	500 ng
dNTP	10 mM
H ₂ O	uzupełniono do 13 µl

Mieszaninę ogrzewano przez 5 minut w 65°C, a następnie przenoszono do lodu na 1 minutę, po czym dodawano:

SKŁAD	OBJĘTOŚĆ/REAKCJE
Bufor 5x First-Strand	4 µl
0,1 M DTT	1 µl
RNasin (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl

Mieszaninę inkubowano przez 60 min w 50°C. Następnie, inaktywowano przez 15 minut w 70°C.

- **Dla krótkich cząsteczek RNA**

Wyizolowane RNA zawieszano w 8 µl sterylnej H₂O i dodawano mieszaninę:

SKŁAD	OBJĘTOŚĆ/REAKCJE
Bufor 2,5x miRNA-RT	10 µl
Mieszanina rybonukleotydów 5x miRNA	5 µl
Polimeraza <i>E. coli</i> Poly(A)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl

Następnie, próby inkubowano przez 60 min w 37°C. Inaktywowano przez 10 minut w 85°C.

4.3.4 qPCR (ang. *quantitative PCR*)

1. cDNA do reakcji rozcieńczano 4-krotnie.
2. Przygotowywano mieszaninę zawierającą:

SKŁAD	OBJĘTOŚĆ/REAKCJE
PowerSYBR® Green PCR Master Mix	5 µl
Mieszaniny starterów Forward+Reverse	4 µl
Rozcieńczona matryca	1 µl

3. Reakcję qPCR przeprowadzano w termocyklerze QuantStudio™ 6 (Thermo Fisher Scientific):

ETAPY	TEMPERATURA [°C]	CZAS
Denaturacja wstępna	95	10 min.
Amplifikacja	95	15 sek.
40 cykli	60	1 min.

4.3.5 RNA-seq

Jakość RNA sprawdzano za pomocą zestawu gotowych odczynników Agilent RNA 6000 Nano korzystając z urządzenia Agilent Bioanalyzer 2100. Do przygotowania bibliotek wybierano próbki o parametrze integralności RNA (RIN) > 8,0. Biblioteki przygotowywano z 500 ng RNA, z użyciem zestawu CORALL Total RNA-Seq Library, zgodnie z instrukcjami producenta. Do oceny jakości bibliotek używano zestawu Agilent High Sensitivity DNA i urządzenia Agilent, a stężenie bibliotek sprawdzano przy użyciu zestawu Qubit™ dsDNA HS Assay. Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono dla pojedynczych odczytów długości 75 bp przy użyciu platformy Illumina NextSeq 500, z wykorzystaniem serwisu Lexogen NGS (Wiedeń, Austria). Surowe pliki FASTQ poddawano obróbce bioinformatycznej w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4.3.6 Northern blot

1. 6 µg całkowitego RNA rozdzielano w 1,2% denaturującym żelu agarozowym, zawierającym 1x bufor H-E i 6% formaldehyd.
2. Elektroforezę prowadzono przez 7 godzin w 1x buforze H-E z recyrkulacją, przy napięciu 55 V.
3. Po elektroforezie, żel poddawano łagodnej obróbce alkalicznej (10 min w 50 mM NaOH/10 mM NaCl), neutralizacji (10 min w 2,5x TBE) i zrównoważeniu w 2x SSC.

4. RNA przenoszono na membranę nylonową Hybond N+ przez noc, metodą kapilarną z użyciem buforu 20x SSC, a następnie RNA unieruchamiano na membranie przez sieciowanie światłem UV (1200x100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$).
5. W celu wykrycia półproduktów dojrzewania pre-rRNA, membranę najpierw hybrydyzowano w 10 ml buforu pre-hybrydyzacyjnego przez 1 h w 60°C.
6. Następnie, roztwór pre-hybrydyzacyjny usuwano i dodawano 5 ml świeżego buforu hybrydyzacyjnego wraz z sondą DNA znakowaną DIG, o końcowym stężeniu 2 nM. Membranę inkubowano z sondą przez 1 h w 60°C, a następnie przez noc w 37°C. Zastosowano sondy opisane w rozdziale 3.4.
7. Następnego dnia membranę przemywano dwukrotnie buforem 2x SSC z 0,1% SDS, a następnie sześciokrotnie buforem 0,2x SSC z 0,1% SDS, w temperaturze hybrydyzacji.
8. Po płukaniu, membranę poddawano immunodetekcji z użyciem przeciwciała przeciwko digoksigenie, a pasma immunoreaktywne wizualizowano przy użyciu substratu chemiluminescencyjnego CDP-Star (Sigma-Aldrich), według protokołu: membranę płukano dwukrotnie w 10 ml buforu płuczącego, blokowano przez 40 min w 10 ml roztworu blokującego, inkubowano z 10 ml roztworu przeciwciała (1:2500) przez 1 godzinę, płukano czterokrotnie w buforze płuczącym, równoważono przez 5 min w buforze detekcyjnym, inkubowano z substratem CDP-Star, a następnie naświetlano w aparacie G-BOX (TK Biotech).

4.4. Techniki pracy z DNA

4.4.1 Izolacja DNA genomowego (gDNA)

Izolację genomowego DNA przeprowadzano za pomocą gotowego zestawu odczynników EXTRACTME® Genomic DNA postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

4.4.2 PCR

W reakcji PCR wykorzystywano polimerazę DNA *Pfu* (Thermo Scientific), natomiast do długich matryc - polimerazę DNA CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Clontech Laboratories).

- Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy *Pfu*:

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor (10x)	1x

dNTP (10 mM)	0,2 mM
Starter Forward	0,24 μ M
Starter Reverse	0,24 μ M
Polimeraza DNA <i>Pfu</i> (5 U/ μ l)	5 U
Matryca	15-20 ng

Warunki reakcji PCR:

ETAPY	TEMPERATURA [°C]	CZAS
Denaturacja wstępna	95	10 min.
Amplifikacja 35 cykli	Denaturacja	30 sek.
	Hybrydyzacja	30 sek.
	Elongacja	3 min./1 kb
Elongacja końcowa	72	10 min.
Schłodzenie	4	∞

- Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy DNA CloneAmp™ HiFi:

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
CloneAmp™ HiFi PCR Premix	1x
Starter Forward	0,2-0,3 μ M
Starter Reverse	0,2-0,3 μ M
Matryca	<100 ng

Warunki reakcji PCR:

ETAPY	TEMPERATURA [°C]	CZAS
Denaturacja wstępna	95	10 min.
Amplifikacja 35 cykli	Denaturacja	10 sek.
	Hybrydyzacja	15 sek.
	Elongacja	1 min./1 kb
Elongacja końcowa	72	10 min.
Schłodzenie	4	∞

4.4.3 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Do prób dodawano bufor obciążający DNA 6x Orange (rozdział 3.3.) i markery: 1kb Plus lub 100bp Plus. Przygotowanie żelu i warunki elektroforezy były takie same, jak opisano przy elektroforezie RNA (rozdział 4.3.2).

4.4.4 Elucja DNA z żelu agarozowego

Ekstrakcję DNA z żelu agarozowego przeprowadzano za pomocą zestawu GeneJET Genomic DNA Purification zgodnie z zaleceniami producenta.

4.4.5 Trawienie restrykcyjne

W reakcji trawienia restrykcyjnego plazmidów i produktów reakcji PCR, stosowano enzymy restrykcyjne typu FastDigest®.

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Plazmid/Insert	500 ng
Bufor FastDigest (10x)	1x
Enzym	1 U/ μ l

Mieszaninę inkubowano w termomikserze w 37°C przez 2 godziny. Inaktywowano przez 20 minut w temperaturze 80°C.

4.4.6 Defosforylacja końców 5'

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor FastAP (10x)	1x
Enzym FastAP	1 U
Plazmid/liniowe DNA	1 μ g

Mieszaninę inkubowano w termomikserze w 37°C przez 10 minut. Inaktywowano przez 20 minut w temperaturze 65°C.

4.4.7 Reakcja ligacji

SKŁAD	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor T4 DNA Ligaza (10x)	1x
Ligaza T4 DNA (5u/μL)	0,25 U
Wektor	50 ng
Insert	wyliczona na podstawie wzoru

Stosunek molowy insertu:wektora wynosił 5:1 lub 3:1. Wzór na podstawie, którego wyliczano objętość insertu:

$$\frac{\text{ng wektora} \times \text{kb insertu}}{\text{kb wektora}} \times \text{insert:wektor stosunek molowy} = \text{ng insertu}$$

Reakcja ligacji była prowadzona przez całą noc w 4°C.

4.5. Techniki pracy z białkami

4.5.1 Ekstrakcja białek

1. Zamrożony osad komórkowy z buteleczki T-25 rozpuszczano w 200 μ l lekkiego buforu do ekstrakcji białek (rozdział 3.3.).
2. Mieszaninę inkubowano 30 minut na lodzie.
3. Następnie, dodawano 5M roztwór NaCl do końcowego stężenia 150 mM.
4. Próby wirowano przy prędkości 16000 g w 4°C przez 30 minut.
5. Supernatant zawierający białka przenoszono do nowych probówek.

4.5.2 Kolorymetryczny pomiar stężenia białek

1. Odczynnik barwiący do oznaczania białek (Biorad) rozcieńczano z wodą w stosunku objętościowym 1:4.
2. Następnie, przygotowywano próby zawierające 980 μ l rozcieńczonego odczynnika, 15 μ l buforu do ekstrakcji białek oraz 5 μ l ekstraktu białkowego.
3. Próby inkubowano przez 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej.
4. Krzywą wzorcową przygotowywano wykorzystując próby o następujących, wzrastających stężeniach białka BSA: 2 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 8 mg/ml i 10 mg/ml.
5. Pomiar absorbancji prowadzono względem próby ślepej (bufor do ekstrakcji), przy długości fali $\lambda=595$ nm. Stężenia badanych białek wyliczono z krzywej wzorcowej.

4.5.3 Immunoprecypitacja

- **Na kuleczkach magnetycznych skoniungowanych z białkiem G**
 1. Z ekstraktu białkowego pobierano 5-10% objętości na „input”.
 2. Przygotowywano próby zawierające: 25 μ l kuleczek magnetycznych, 2-3 μ g przeciwciała i bufor PBS-T do końcowej objętości 400 μ l.
 3. Próby umieszczano na rotatorze i inkubowano przez godzinę w 4°C, przy prędkości 3-4 rpm.
 4. Po inkubacji próby przemywano dwukrotnie 500 μ l buforu PBS-T, za każdym razem mieszając na rotatorze z prędkością 8 rpm przez 10 minut w 4°C. Supernatant za każdym razem usuwano, korzystając ze statywu magnetycznego.
 5. Do kuleczek dodawano po 250 μ g ekstraktu białkowego i uzupełniano buforem PBS-T do 400 μ l.
 6. Próby umieszczano na rotatorze i inkubowano przez dwie godziny w 4°C, przy prędkości 3-4 rpm.
 7. Następnie, próby płukano trzykrotnie 500 μ l PBS-T, tak jak opisano w punkcie 4.
 8. Elucję prowadzono przez dodanie 60 μ l buforu 1xSSB i inkubację 10 minut w 95°C, po czym przenoszono supernatant do nowych probówek. Jeśli próby były przeznaczone do izolacji RNA, elucję prowadzono przez dodanie 100 μ l

odczynnika TRIzol (rozdział 3.3.) i dalej postępowano według protokołu do izolacji RNA (rozdział 4.3.1).

- **Na kuleczkach magnetycznych skoniungowanych z przeciwciałem anty-FLAG**

1. Z ekstraktu białkowego pobierano 5-10% objętości na „input”.
2. Do probówek dodawano po 25 μ l kuleczek magnetycznych z przeciwciałem anty-FLAG i 5-krotnie przemywano buforem PBS-T. Supernatant za każdym razem usuwano, korzystając ze statywu magnetycznego.
3. Następnie, do probówek dodawano po 250 μ g ekstraktu białkowego i uzupełniano buforem PBS-T do 400 μ l.
4. Próby inkubowano na rotatorze z prędkością 3-4 rpm przez całą noc w 4°C.
5. Następnie, próby płukano trzykrotnie buforem PBS-T, za każdym razem mieszając na rotatorze z prędkością 8 rpm przez 10 minut w 4°C.
6. Próby eluowano tak samo, jak opisano w punkcie 8 powyżej.

- **Przy użyciu μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit**

W przypadku komórek HEK WT i HEK UL1 KO wysłanych do analiz metodą spektrometrii mas, immunoprecypitację przeprowadzano z użyciem gotowego zestawu odczynników μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation i postępowano zgodnie z dołączonym protokołem.

4.5.4 Strącanie białek za pomocą kwasu trichlorooctowego - TCA

1. Do 100 μ l ekstraktu białkowego dodawano 50% TCA do stężenia końcowego 10% i Tween 20 do stężenia końcowego 0,5%.
2. Następnie, próby inkubowano na lodzie przez 30 minut.
3. Po inkubacji, próby wirowano przez 10 minut w 4°C z prędkością 800 g.
4. Osady przemywano zimnym 10% TCA.
5. Próby ponownie wirowano przez 10 minut w 4°C z prędkością 2800 g.
6. Osady przemywano dwukrotnie zimnym 90% acetonem.
7. Próby wirowano przez 10 minut w 4°C z prędkością 2800 g.
8. Supernatant usuwano dokładnie znad osadu, po czym osad suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane próby wysyłano do analiz.

4.5.5 Immunoprecypitacja chromatyny - ChIP

1. Komórki HEK WT oraz HEK UL1 KO trypsynizowano, przemywano buforem 1x PBS i sieciowano przy użyciu 10 ml 1% formaldehydu przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
2. Po tym czasie, reakcję sieciowania zatrzymywano dodając 800 µl 1 M glicyny i inkubując przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
3. Komórki wirowano przy prędkości 1000 g przez 1 minutę w 4°C, a osad przemywano buforem 1x PBS, następnie zawieszano w buforze lizującym, pipetując aż do uzyskania jednorodnej zawiesiny.
4. Po lizie, komórki wirowano przy prędkości 12000 g przez 1 minutę w 4°C, a osad zawieszano w 1 ml buforu sonikacyjnego.
5. Komórki poddawano sonikacji przez 30 cykli z wysoką intensywnością: 30 sekund ON/30 sekund OFF, w temperaturze 4°C przy użyciu sonikatora Bioruptor Plus, w celu wygenerowania fragmentów DNA o długości od 200 do 700 bp.
6. Rozmiary pofragmentowanego DNA weryfikowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym.
7. Przed analizą w żelu agarozowym próbki poddawano działaniu 1 U RNazy A w temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie, dodawano 20 ng proteinazy K i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 45°C przy prędkości 1000 g.
8. Po sonikacji, resztki komórkowe usuwano, odwirowując komórki z prędkością 11200 g przez 10 minut w 4 °C. Supernatant przenoszono do nowej probówki; 10% supernatantu pozostawiano jako „input”.
9. 100 µl roztworu przenoszono do nowej probówki i rozcieńczano 10-krotnie buforem do rozcieńczania (rozdział 3.3.), tę próbę dalej używano jako kontrolę IgG.
10. Pozostały roztwór również rozcieńczano dziesięciokrotnie buforem do rozcieńczania i tę próbę dalej używano do immunoprecypitacji.
11. Do próby kontroli IgG dodawano 1 µg przeciwciała IgG, natomiast do prób właściwych dodawano 5 µg przeciwciała anti-RPA194.
12. Następnie, próbki odwirowywano przy prędkości 600 g przez 20 minut w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu, 90% roztworu przenoszono do świeżej probówki, a resztę odrzucano.

13. W celu immunoprecypitacji, do roztworów z punktu 11 dodawano 190 μ l kuleczek z białkiem G i inkubowano przez 6 godzin w 4°C na rotatorze z prędkością 50 rpm.
14. Następnie, próbki przemywano sześciokrotnie buforem do lizy, za każdym razem umieszczając na rotatorze na 3 minuty w 4°C. Ostatnie przemycie prowadzono w buforze TE.
15. Do kuleczek magnetycznych dodawano po 200 μ l buforu elucyjnego i mieszano na rotatorze przez 15 minut z prędkością 10 rpm w temperaturze pokojowej.
16. Po separacji na statywie magnetycznym, supernatant przenoszono do nowych probówek i dodawano po 8 μ l 5 M NaCl i 4 μ l 0,5 M EDTA pH 8,0, w celu usunięcia wiązań krzyżowych z immunoprecypitowanej chromatyny; próby inkubowano przez noc w 65°C na rotatorze z prędkością 10 rpm.
17. Próby poddawano dalszemu trawieniu przez dodanie 10 μ g RNazy A i inkubację w temperaturze 37°C przez 30 min. Następnie, dodawano 8 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 4 μ l 0,5 M EDTA i 20 ng Proteiny K, a próby inkubowano przez 2 godziny w 45°C, wytrząsając w termocyklerze z prędkością 1000 rpm.
18. Wytrącony DNA analizowano metodą qPCR z użyciem specyficznych par starterów, opisanych w rozdziale 3.4.

4.5.6 Western blot połączony z immunodetekcją

- **Przygotowanie żeli poliakrylamidowych (PAA)**

Skład żelu rozdzielającego:

SKŁADNIK	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor A (4x)	1x
30% PAA	8-15%
H ₂ O	uzupełniano do 10 ml
TEMED	33 μ l
APS	33 μ l

Skład żelu zagęszczającego:

SKŁADNIK	ILOŚĆ/STĘŻENIE KOŃCOWE
Bufor B (4x)	1x
30% PAA	5%
H ₂ O	uzupełniano do 5 ml
TEMED	12,5 μ l
APS	25 μ l

Najpierw przygotowywano mieszaninę buforu, PAA i wody, bezpośrednio przed wylaniem żelu między szyby dodawano katalizatory polimeryzacji, TEMED i APS. Proces polimeryzacji żelu trwał około 30 minut.

- **Elektroforeza w warunkach denaturujących SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*)**

1. Gotowe, spolimeryzowane żele umieszczono w aparacie do elektroforezy wypełnionym buforem 1x Laemmli (rozdział 3.3.).
2. Próby białkowe obciążano buforem 1x SSB i denaturowano przez 5 minut w 95°C, po czym nakładano na żel.
3. Elektroforezę prowadzono według parametrów: 250 V, 25 mA, 300 W przez 1,5 godziny.

- **Transfer półsuchy**

1. W aparacie do transferu układano tzw. „kanapkę”, która składała się, po kolei, z: trzech bibułek Whatmann uprzednio namoczonych w buforze do transferu (rozdział 3.3.), membrany PVDF (aktywowanej wcześniej w metanolu), żelu po rozdiale, trzech bibułek Whatmann uprzednio namoczonych w buforze do transferu.
2. Transfer prowadzono przez 1 godzinę, przy parametrach 15 V i 1,5 A.
3. Po transferze, membranę blokowano w 15 ml buforu TBS-T z dodatkiem 5% BSA lub 5% odtłuszczonego mleka, inkubując na kołysce przez całą noc w 4°C.

- **Immunodetekcja**

1. Membranę inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi w buforze TBS-T mieszając na kołysce przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Optymalne rozcieńczenia przeciwciał użytych do eksperymentów przedstawiono w rozdziale 3.8.
2. Następnie, membranę płukano trzykrotnie w buforze TBS-T, mieszając na kołysce przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
3. Membranę inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi (rozdział 3.8) w buforze TBS-T mieszając na kołysce przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

4. Membranę ponownie płukano, tak jak opisano w punkcie 2.
5. Na membranę nakładano odczynnik do chemiluminescencji (ECL), (odczynnik A i odczynnik B uprzednio zmieszany w proporcji 1:1). Membranę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
6. Membranę wywołymano w aparacie do chemiluminescencji G-BOX.

- **Wybarwienie membrany odczynnikami Ponceau S**

1. Membranę barwiono kilka sekund w odczynniku Ponceau S.
2. Następnie płukano kilkakrotnie w wodzie destylowanej w celu pozbycia się tła.
3. Zdjęcie wykonywano w aparacie Azure Biosystem.

4.5.7 Spektrometria mas

Analizę spektrometrii mas przeprowadzono w Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (PAN), Warszawa, Polska.

4.5.8 Phos-taq

Eksperyment został przeprowadzony zgodnie z protokołem dołączonym do odczynnika Phos-tag™ SDS-PAGE.

4.5.9 Profilowanie polisomów

1. Do eksperymentu posiewano 5×10^6 komórek HEK WT oraz HEK UL1 KO, w buteleczkach T175 (175 cm²), w pożywce suplementowanej DMEM bez antybiotyków, w trzech powtórzeniach biologicznych.
2. Po 24 godzinach od posiania, do komórek dodawano 100 µg/ml cykloheksymidu i inkubowano 5 minut w 37°C w celu zahamowania elongacji translacji i związania rybosomów na transkryptach.
3. Po tym czasie komórki przemywano zimnym buforem 1x PBS zawierającym 100 µg/ml cykloheksymidu i zbierano do 1,5 ml probówek przez zeszkobanie.
4. Komórki wirowano przy prędkości 200 g przez 5 minut w 4°C i lizowano w 500 µl zimnego buforu lizującego.
5. Po 10 minutach inkubacji na lodzie lizaty odwirowywano przy prędkości 1500 g przez 5 minut w 4°C.
6. Supernatant zbierano i mierzono wartość OD przy 260 nm.

7. 10-60% gradient ciągły sacharozy przygotowywano przy użyciu Gradient Station (BioComp) w buforze do gradientu (rozdział 3.3).
8. Próbkę w ilości odpowiadającej 10 OD nakładano na schłodzony gradient sacharozy i wirowano przy prędkości 287730 g przez 2 godziny 40 minut w 4°C, w ultrawirówce Beckman Coulter, rotor SW 41Ti.
9. Po wirowaniu, zbierano 12 frakcji o objętości 0,97 ml, za pomocą urządzenia Gradient Frakcjonator (BioComp), profile polisomów analizowano za pomocą programu Gradient Profiler.

4.6. Techniki mikroskopowe

4.6.1 FISH połączony z immnofluorescencją

1. Komórki przemywano buforem 1x PBS.
2. Komórki utrwalano w 250 µl 4% PFA (w PBS) przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
3. Przepłukiwano dwukrotnie buforem 1x PBS.
4. Przemywano dwukrotnie przez 5 minut schłodzonym 70% EtOH.
5. Permeabilizowano w 70% EtOH w 4°C przez 24 godziny.
6. Przemywano trzykrotnie przez 5 minut buforem 1x PBS w temperaturze pokojowej.
7. Blokowano komórki trzykrotnie przez 10 minut roztworem blokującym w temperaturze pokojowej.
8. Inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym przez 1 godzinę w 37°C, następnie przez kolejną godzinę w temperaturze pokojowej.
9. Przemywano trzykrotnie przez 10 minut roztworem blokującym.
10. Inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym przez 45 minut w temperaturze pokojowej.
11. Przemywano trzykrotnie przez 5 minut buforem 1x PBS w temperaturze pokojowej.
12. Przemywano dwukrotnie buforem 1x PBS.
13. Przemywano dwukrotnie 1x SSC.
14. Płukano przez 5 minut w 2x SSC w temperaturze pokojowej.
15. Wstępną hybrydyzację prowadzono przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
16. Dodawano 75 ng sondy na 150 µl buforu pre-hybrydyzacyjnego. Hybrydyzację prowadzono przez całą noc w 42°C.

17. Przemycano dwukrotnie przez 30 minut w 42°C buforem płuczącym 1.
18. Przemycano dwukrotnie przez 15 minut w 42°C buforem płuczącym 2.
19. Przemycano dwukrotnie przez 15 minut w 42°C buforem płuczącym 3.
20. Przemycano dwukrotnie przez 10 minut w 42°C wysoko wydajnym buforem płuczącym (rozdział 3.3.).
21. Płukano przez 10 minut wysoko wydajnym buforem płuczącym z DAPI (100 ng/μl).
22. Przemycano dwukrotnie przez 10 minut w 42°C wysoko wydajnym buforem płuczącym.

4.6.2 Barwienie immunologiczne

- **Utrwalenie komórek**

1. Komórki hodowano na 8-dołkowych płytках mikroskopowych w ilości końcowej 50000 komórek/dołek.
2. Z dołków odsączano pożywkę DMEM.
3. Komórki dwukrotnie przepłukiwano 200 μl buforu 1x PBS.
4. Do komórek dodawano 200 μl 4% PFA (paraformaldehyd), płytki mikroskopowe umieszczano na kołyszce laboratoryjnej i inkubowano przez 12 minut w temperaturze pokojowej.
5. Po tym czasie komórki pięciokrotnie przemycano 200 μl buforu 1x PBS, ostatnie płukanie pozostawiano na 3 minuty.

- **Permeabilizacja błony komórkowej**

1. Do komórek dodawano 200 μl 1x PBS z dodatkiem 0,5% Triton[®]X-100, po czym inkubowano na kołyszce przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
2. Komórki przepłukiwano trzykrotnie 200 μl 1x PBS.
 1. Po utrwalaniu i permeabilizacji błony komórkowej, komórki inkubowano w roztworze blokującym przez 30 minut i utrwalono w 4% PFA przez 5 minut.
 2. Potem komórki inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi (1:200) w roztworze blokującym przez 1 godzinę (rozdział 3.8.).
 3. Następnie, komórki płukano trzykrotnie przez 10 minut w buforze 1x PBS.
 4. Kolejno, komórki inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi (1:200) w roztworze blokującym przez 45 minut (rozdział 3.8.).

5. Ponownie komórki płukano trzykrotnie przez 10 minut buforem 1x PBS.
6. Następnie, komórki barwiono roztworem DAPI przez 10 minut.
7. Zdjęcia wykonywano przy użyciu konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus Fluoview 1200 IX83 z obiektywem olejowym 60x. Do akwizycji obrazów wykorzystano trzy kanały o następujących parametrach wzbudzenia: 488 nm dla Alexa Fluor 488, 559 nm dla Alexa Fluor 555 i 405 nm dla DAPI. Uzyskane obrazy analizowano za pomocą oprogramowania ImageJ.

4.6.3 PLA

1. Komórki płukano 250 µl buforu 1x PBS.
2. Następnie, dodawano 250 µl 4% PFA i pozostawiano na 10 minut w temperaturze pokojowej.
3. Komórki płukano trzykrotnie w 200 µl buforu 1x PBS przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
4. Do komórek dodawano 250 µl buforu PBS-T i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej na kołyszce laboratoryjnej.
5. Komórki płukano trzykrotnie w 250 µl 1x PBS przez kilka minut w temperaturze pokojowej.
6. Do komórek dodawano 250 µl roztworu blokującego i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej.
7. Roztwór blokujący usuwano i dodawano 200 µl buforu 1x PBS-T z dodatkiem przeciwciał I-rzędowych.
8. Inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na kołyszce laboratoryjnej.
9. Roztworem blokującym płukano trzykrotnie mieszając przez 10 minut w temperaturze pokojowej na kołyszce.
10. Do komórek dodawano 150 µl sondy PLA.
11. Inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
12. Komórki płukano dwukrotnie mieszając przez 10 minut w buforze 1x PBS w temperaturze pokojowej na kołyszce.
13. Płukano dwukrotnie mieszając przez 5 minut w 250 µl buforu do płukania A w temperaturze pokojowej na kołyszce.
14. Do ligacji dodawano 120 µl roztworu ligującego.
15. Inkubowano przez 30 min. w temperaturze 37°C.

16. Płukano dwukrotnie mieszając przez 2 minuty w 250 μ l buforu do płukania A w temperaturze pokojowej na kołysce.
17. Do komórek dodawano 120 μ l roztworu do amplifikacji.
18. Inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C.
19. Płukano trzykrotnie przez 10 minut w 250 μ l buforu do płukania B w temperaturze pokojowej na kołysce.
20. Płukano przez 5 minut w 250 μ l 0,1x buforu do płukania B w temperaturze pokojowej na kołysce.
21. Płukano przez 10 minut w 250 μ l 0,1x buforu do płukania B + DAPI (0,1 μ g/ml) w temperaturze pokojowej na kołysce.
22. Płukano trzykrotnie przez 5 minut z 0,1x buforem do płukania B na kołysce.
23. Usuwano bufor i nakładano kroplę preparatu Prolong Gold, następnie pozostawiano do wyschnięcia na 24 godziny.

5. Wyniki

5.1. Rola hnRNP UL1 w jąderkach komórek ludzkich

W pracy doktorskiej skupiłam się na poznaniu nieznanych dotąd ścieżek molekularnych, w których może uczestniczyć białko hnRNP UL1. Główne badania pracy zainicjowała obserwacja, że hnRNP UL1 kolokalizuje w jąderkach komórek ludzkich z markerem jąderkowym, nukleoliną (Fig. 3A). Analizy te wykonałam z pomocą dr Agaty Stępień, wykorzystując technikę FISH (rozdział 4.6.2) połączoną z immunofluorescencją (rozdział 4.6.3). Co ciekawe, lokalizacja hnRNP UL1 częściowo pokrywała się z lokalizacją jąderkową białka FUS oraz cząsteczki U7 snRNA (Fig. 3B, C). O ile FUS był identyfikowany w proteomie jąderkowym komórek HeLa WT (Levone i in., 2021), obserwacje o jąderkowej lokalizacji hnRNP UL1 i U7 snRNA nie były do tej pory raportowane w literaturze naukowej. Z uwagi na ograniczony czas, w niniejszej pracy doktorskiej skupiłam się jedynie na poznaniu roli białka hnRNP UL1 w jąderkach komórkowych.

5.1.1 Wyprowadzenie linii typu knockout z wyciszeniem genu *HNRNPUL1* w komórkach HEK 293T

Na początku, w celu przeprowadzenia wielu eksperymentów opisanych poniżej, wyprowadziłam linię komórkową z wyciszeniem genu *HNRNPUL1*.

Linię komórkową HEK 293T z delecją w obrębie genu *HNRNPUL1* (HEK UL1 KO) wyprowadziłam przy użyciu systemu CRISPR-Cas9, opartego na edycji genomu z użyciem nukleazy Cas9 (rozdział 4.1.4) (Fig. 4A). W celu sprawdzenia skuteczności tej strategii, część sekwencji obejmującą region delecji analizowałam metodą PCR przy użyciu starterów zaprojektowanych kilka par zasad przed i kilka par zasad za miejscem cięcia (Fig. 4B). Wyciszenie ekspresji genu *HNRNPUL1* potwierdziłam na poziomie białka metodą western blot połączoną z immunodetekcją (rozdział 4.5.6), a następnie immunofluorescencją z użyciem przeciwciał anty-hnRNP UL1 (rozdział 4.6.3) (Fig. 4C i D).

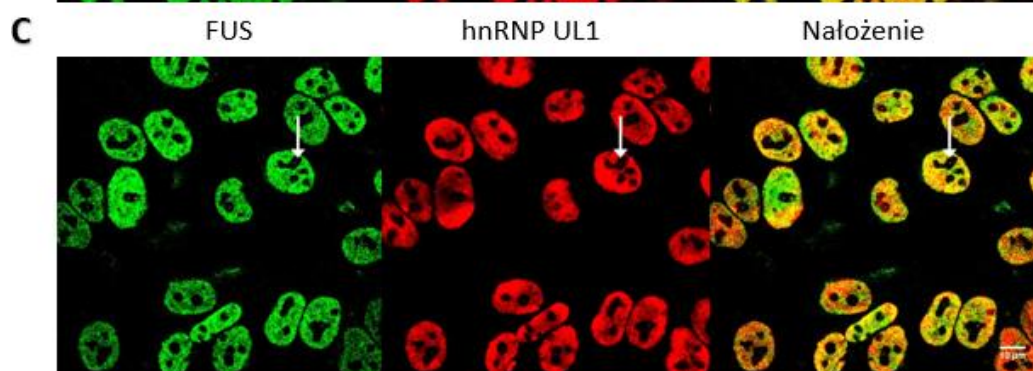
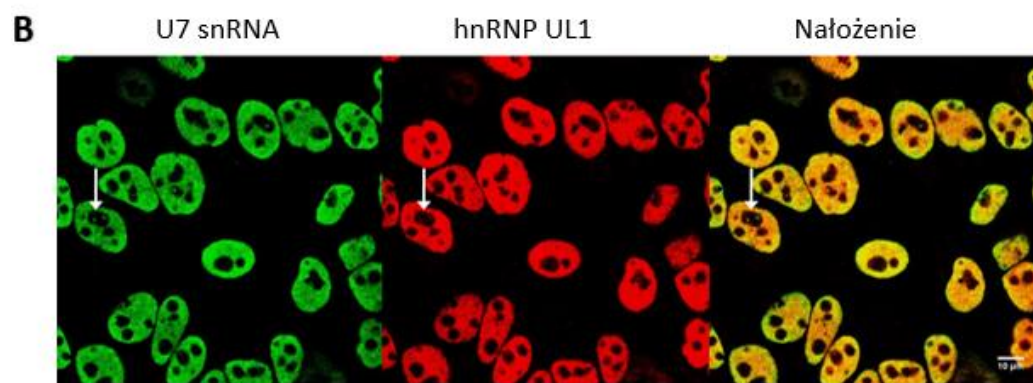
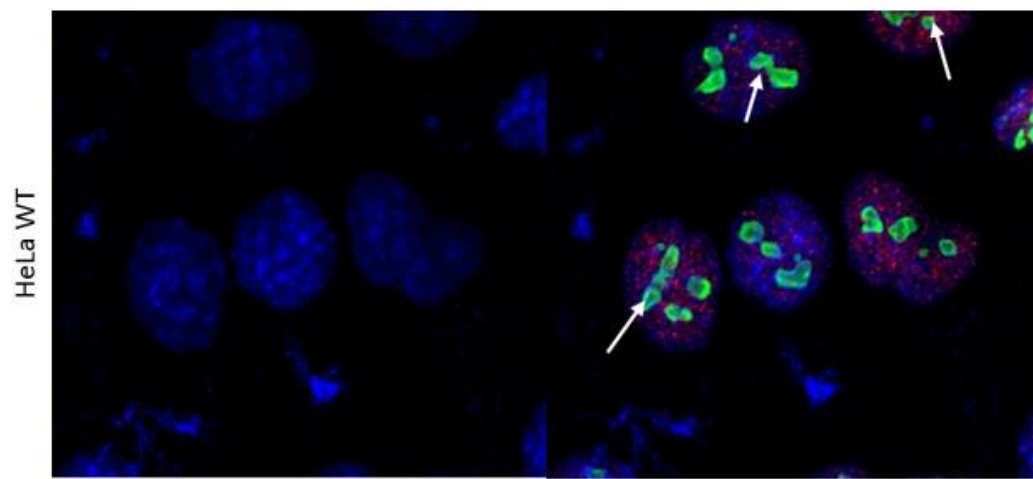
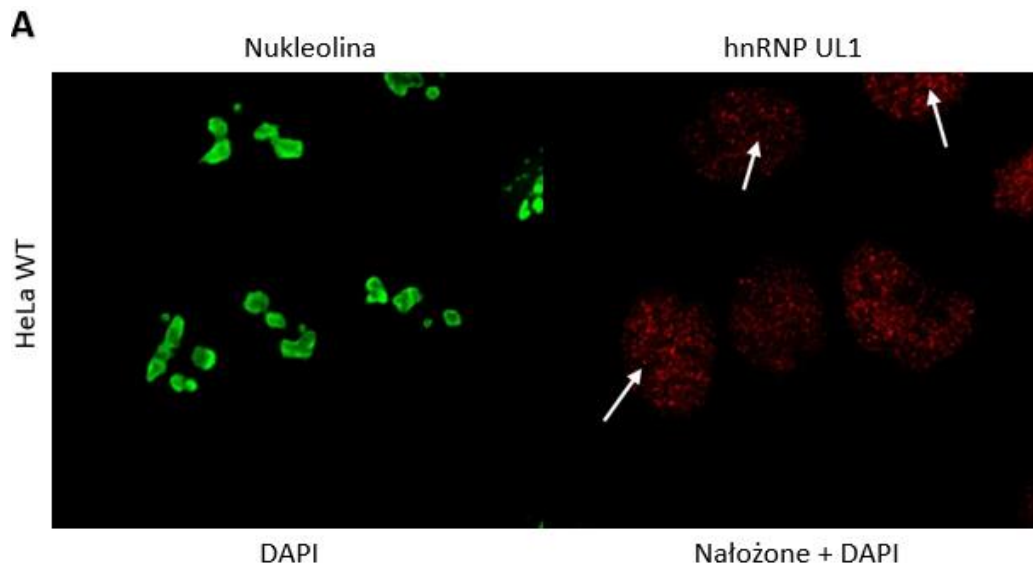


Figura 3. Kolokalizacja hnRNP UL1 z nukleoliną, U7 snRNA i FUS w jąderkach komórkowych komórek HeLa WT. (A) Kolokalizacja hnRNP UL1 i nukleoliny, użyto przeciwciał anti-nukleolina i anti-hnRNP UL1. Do barwienia jąder użyto DAPI. (B) Kolokalizacja hnRNP UL1 i U7 snRNA, (C) kolokalizacja hnRNP UL1 z FUS; białe strzałki wskazują lokalizację jąderkową. Użyto przeciwciała anti-FUS i anti-hnRNP UL1 oraz sondę komplementarną do U7 snRNA. Obserwacje mikroskopowe przeprowadziła dr Agata Stępień (Laboratorium Dojrzwiania RNA, Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza).

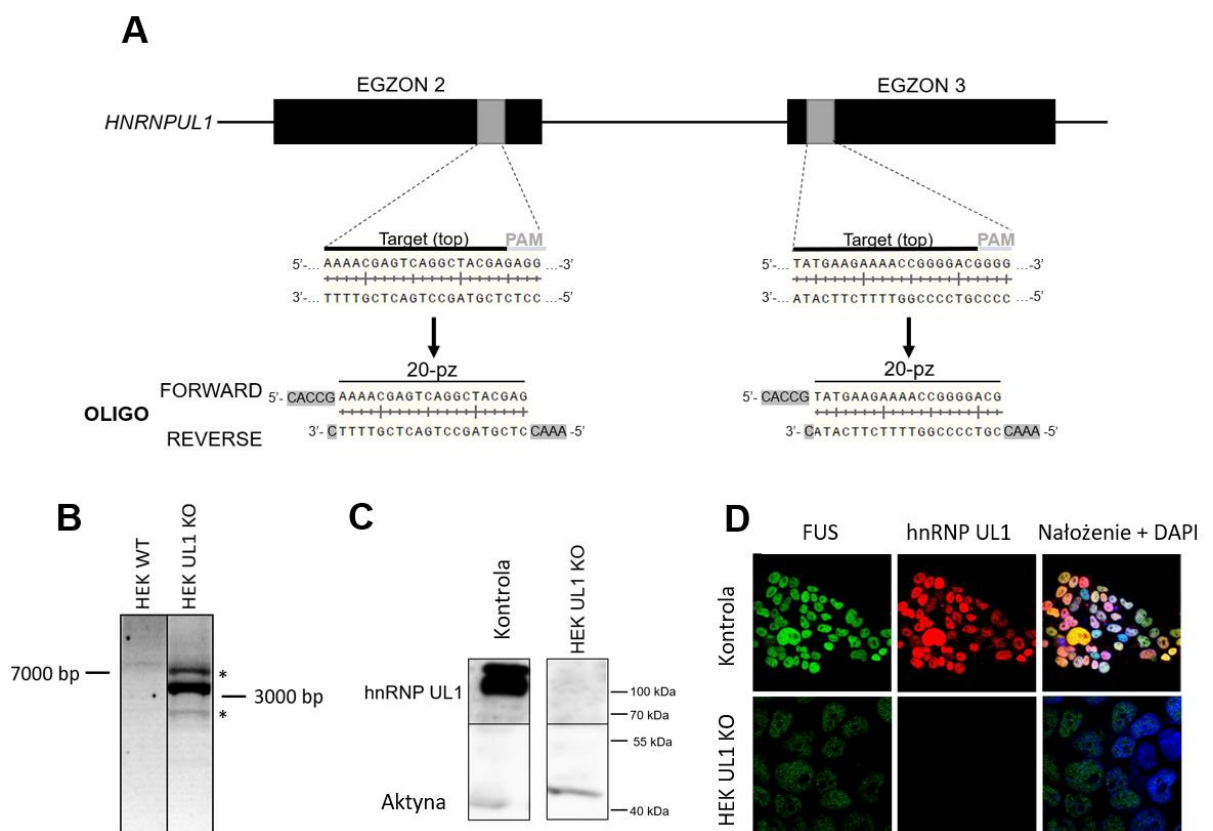


Figura 4. Wyprowadzenie linii komórkowej z wyciszeniem genu *HNRNPUL1*. (A) Do przygotowania komórek HEK UL1 KO wykorzystano system CRISPR-Cas9. Wybrano dwie sekwencje docelowe zlokalizowane na egzonach 2 i 3 (szare pola). Sekwencje docelowe o długości 20 pz (czarna linia) są poprzedzone na końcu 3' motywami 5'-NGG (motywy przylegające do protospaceru (PAM)) (szara linia), gdzie N oznacza dowolny nukleotydy. Oligonukleotydy reprezentujące sekwencje naprowadzające, tzw. gRNA (ang. *guide RNA*) (Forward i Reverse) zawierają nawisy (zaznaczone na szaro) z miejscami restrykcyjnymi rozpoznawanymi przez enzym restrykcyjny *BbsI*, wymaganymi przy

ligacji do plazmidów pSpCas9-2A-EGFP lub pSpCas9-2A-Puro. (B) W celu potwierdzenia delekcji fragmentu genu *HNRNPUL1* w linii komórkowej HEK UL1 KO, wykonano reakcję PCR ze starterami flankującymi fragment usuniętej sekwencji. Po elektroforezie w żelu agarozowym, oczekiwany produkt o długości 7500 pz był widoczny tylko w komórkach HEK WT. W komórkach HEK UL1 KO, po usunięciu części sekwencji genu *HNRNPUL1*, widoczny był produkt o długości 3600 pz. * - produkty niespecyficzne. (C) Analiza western blot połączona z immunodetekcją i (D) immunofluorescencja z użyciem przeciwciała anty-hnRNP UL1 zostały wykonane w celu potwierdzenia wyciszenia białka hnRNP UL1 w komórkach HEK UL1 KO, w porównaniu z komórkami HEK WT (kontrola). Aktyna (Fig. 4C) i FUS (Fig. 4D) zostały użyte jako kontrole. Do barwienia jąder komórkowych użyto DAPI.

5.1.2 Wpływ hnRNP UL1 na poziom rRNA i białka rybosomowe

W celu analizy wpływu wyciszenia białka hnRNP UL1 na transkryptom jąderkowy, przygotowałam biblioteki całkowitego RNA izolowanego z komórek HEK UL1 KO i HEK WT (rozdział 4.3.5), bez etapu usuwania rRNA. Do izolacji użyłam prób po frakcjonowaniu do frakcji CN i NO (rozdział 4.1.8) (Fig. 5). Tak przygotowany RNA został poddany wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu (RNA-seq). Na podstawie uzyskanych wyników zidentyfikowałam transkrypty, których poziom zmieniał się w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami typu dzikiego.

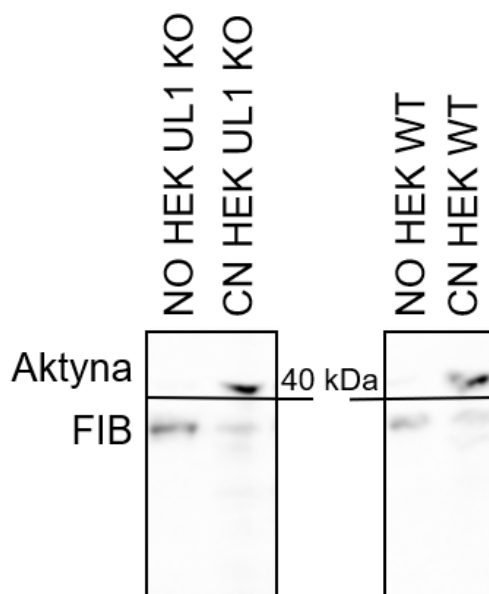


Figura 5. Sprawdzenie jakości wyizolowanych jąder z komórek HEK UL1 KO i HEK WT. Przeciwciała anty-fibrylaryna (FIB) zostało użyte jako marker frakcji NO, natomiast przeciwciała anty-aktyna zostało użyte jako marker frakcji CN.

Jak pokazuję w Tabeli 1., gdzie umieściłam wybrane transkrypty, zarówno we frakcji CN, jak i NO, zaobserwowałam znacząco obniżone (wartość $p < 0.05$) poziomy 5S, 5.8S, 18S, 28S i 45S rRNA, w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami HEK WT.

Tabela 1. Ekspresja wybranych genów rRNA w komórkach z wyciszeniem hnRNP UL1.

Identyfikator genu	Średnia bazowa	Krotność zmiany	p.value	p.adj	Frakcja
RNA5-8SP8	92224,52912	0,300	0,000	0,000	CN
RNA5SP74	111,7623806	0,378	0,005	0,020	CN
RNA5-8SN3	52744,81405	0,526	0,030	0,202	NO
RNA5SP506	310,3483873	0,546	0,020	0,165	NO
RNA18SN3_1	1329605,513	0,597	0,033	0,210	NO
RNA45SN3_1	2388683,306	0,615	0,036	0,219	NO
RNA28SN1	1019822,894	0,624	0,035	0,217	NO
RNA18SN3	2506339,157	0,738	0,005	0,020	CN
RNA45SN3_1	4109132,44	0,793	0,021	0,068	CN

Następnie, w celu identyfikacji białek oddziałujących z hnRNP UL1 w jąderku komórkowym, przeprowadziłam przejściową ekspresję białka hnRNP UL1 z metką FLAG w komórkach HEK 293T (rozdział 4.1.6). Dwadzieścia cztery godziny po transfekcji izolowałam ekstrakty białkowe z całych komórek i poddawałam je immunoprecypitacji z przeciwciałem anty-FLAG; komórki nietransfekowane stosowałam jako kontrolę. Immunoprecypitowane białka poddałam identyfikacji z użyciem spektrometrii masowej. Wśród czynników oddziałujących z hnRNP UL1 znajduje się 5 białek określonych jako białka rybosomowe lub białka biorące udział w składaniu rybosomów (Fig. 6A, B). Wszystkie wybrane białka wykazują lokalizację jąderkową. Należą do nich: RRP1B (ang. *riobosomal RNA processing protein 1 homolog B*), BXDC2/BRX1 (ang. *ribosome biogenesis protein BRX1 homolog*), RBM28 (ang. *RNA-binding protein 28*), NUFIP2 (ang. *nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2*) RPS3A (ang. *40S ribosomal protein S3a*).

A

UniProt	Nazwa genu	IP (Ave spectral)	Kontrola (Ave spectral)	LogFC	p.value	p.adj
Q14684	RRP1B	3,8	0	4,901	0,002311	0,03575
Q8TDN6	BRIX1	1,8	0	3,867	0,03222	0,1811
Q9NW13	RBM28	1,7	0	3,747	0,03821	0,2086
Q7Z417	NUFIP2	5,7	1	2,089	0,02227	0,1409
P61247	RPS3A	11,2	2	2,123	0,001898	0,03072

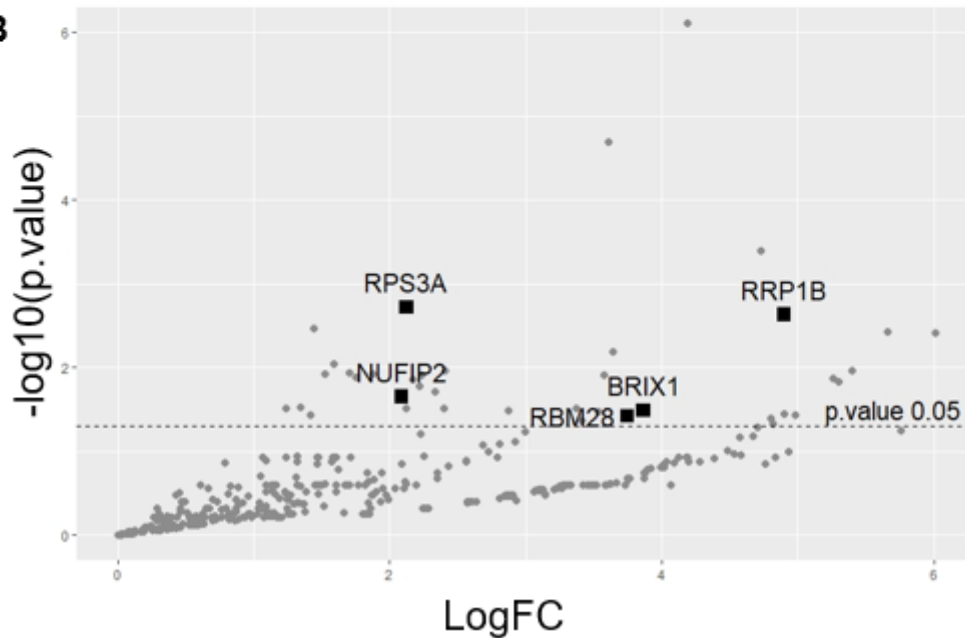
B

Figura 6. Identyfikacja białek, które oddziałują z hnRNP UL1. (A) Ekstrakt białkowy z komórek HEK 293T po przejściowej nadekspresji FLAG-hnRNP UL1 wykorzystano do immunoprecypitacji połączonej ze spektrometrią mas. IP (Ave spectral) i kontrola (Ave spectral) to średnie liczby widm wykrytych dla danego białka, odpowiednio dla IP i kontroli. Położenie białek opisanych w (A) zostały zaznaczone na wykresie (B).

Podsumowując, zarówno wyniki immunofluorescencji (Fig. 3), RNA-seq (Tabela 1) jak i IP (Fig 6) sugerują, że hnRNP UL1 może być zaangażowany w jąderku komórkowym w transkrypcję genów rRNA, dojrzewanie pre-rRNA, i/lub biogenezę rybosomów.

5.1.3 Wpływ hnRNP UL1 na regulację transkrypcji genów rRNA

W kolejnym etapie badałam wydajność transkrypcji genów rRNA oraz poziom prekursorów (45S i 47S) i dojrzałych rRNA (5S, 5.8S, 18S i 28S) w komórkach HEK WT i HEK UL1 KO, za pomocą, odpowiednio, techniki ChIP oraz RT-qPCR i Northern blot. Eksperyment ChIP (rozdział 4.5.5) przeprowadziłam na frakcjach całych komórek (WC) z użyciem przeciwciała anty- RPA194 (podjednostka RNA Pol I), następnie wykonałam qPCR ze starterami zaprojektowanymi do amplifikacji różnych regionów genu rRNA (Fig. 7A). Jak widać na Fig. 7B, wiązanie RNA Pol I w regionie promotora rDNA oraz w regionach 5.8S, 18S i 47S rDNA jest istotnie obniżone w komórkach z wyciszeniem hnRNP UL1. Wyniki te wskazują, że hnRNP UL1 może odgrywać rolę w transkrypcji genów rRNA i pośredniczyć w wiązaniu RNA Pol I do loci genów rRNA w jąderkach komórkowych, co prowadzi do represji transkrypcyjnej w komórkach z wyciszeniem hnRNP UL1. Aby to potwierdzić, wykonałam reakcję qPCR na cDNA przygotowanym z RNA izolowanego z frakcji WC, NO i CN, komórek HEK WT i HEK UL1 KO (Fig. 8A-C). Jak widać na figurze 8A-B, zaobserwowałam obniżony poziom 5.8S rRNA we frakcji WC i CN, natomiast obniżony poziom 47S i 28S rRNA zaobserwowałam we frakcji jąderkowej (Fig. 8C). We frakcji jąderkowej zaobserwowałam również obniżony poziom 5S rRNA, który jest syntetyzowany przez polimerazę RNA III.

Następnie, metodą Northern blot z użyciem sond pozwalających na identyfikację prekursorów rRNA, produktów pośrednich dojrzewania pre-rRNA i dojrzałych rRNA (rozdział 4.3.6), wykonaną przez dr Patrycję Plewkę (Laboratorium Dojrzewania RNA, Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza) wykazaliśmy, że zgodnie z wynikami ChIP-qPCR, akumulacja pierwotnych transkryptów 47S i w konsekwencji produktów pośrednich 30S, 26S, 21S i 18S-E rRNA, jest obniżona w komórkach HEK UL1 KO (Fig. 8D).

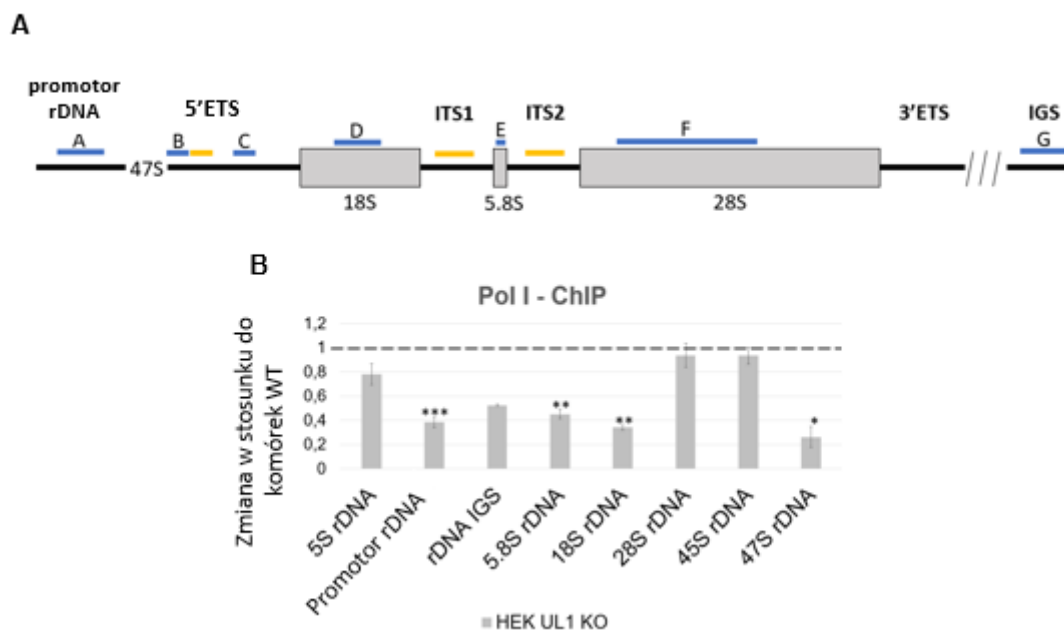


Figura 7. Regulacja ekspresji genów rRNA przez hnRNP UL1. (A) Schemat przedstawiający 47S pre-rRNA wraz z pozycjami starterów i sond użytych, odpowiednio, w qPCR i Northern blot. Miejsca par starterów PCR zaznaczono kolorem niebieskim: A – promotor rDNA, B – 47S rDNA, C- 45S rDNA, D – 18S rDNA, E – 5.8S rDNA, F – 28S rDNA i G – IGS rDNA. Kolorem żółtym oznaczono sondy do Northern blot: 5’ETS, ITS1 i ITS2. (B) Wiązanie RNA Pol I w różnych regionach rRNA oceniano ilościowo metodą ChIP połączoną z qPCR w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami HEK WT. 5S rRNA został użyty jako kontrola negatywna. Słupki błędów przedstawiają wartości SD z trzech powtórzeń biologicznych. Wartości P obliczono za pomocą testu t-Studenta, a istotność statystyczną przedstawiono w następujący sposób: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

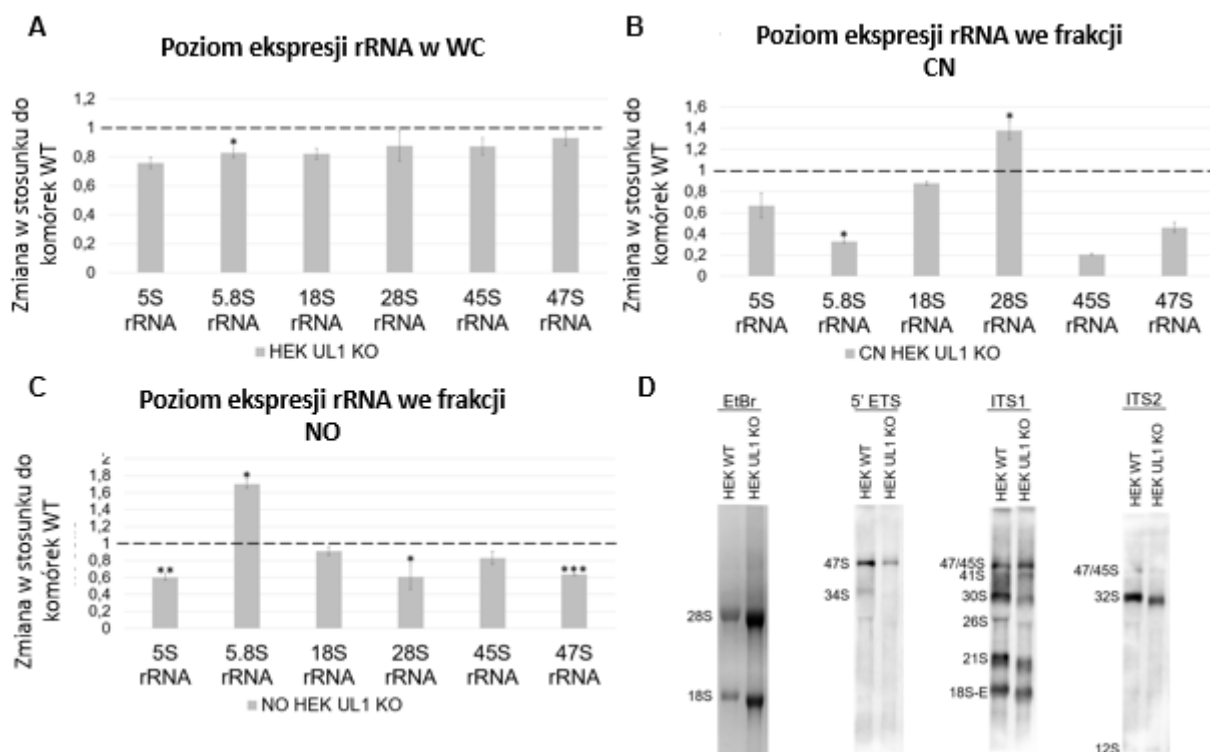


Figura 8. Regulacja ekspresji genów rRNA przez hnRNP UL1. Ekspresję genów rRNA analizowano we frakcji WC (A) oraz we frakcji CN (B) i NO (C) wyizolowanych z komórek HEK WT i HEK UL1 KO. Słupki błędów przedstawiają wartości SD dla trzech powtórzeń biologicznych. Wartości P obliczono za pomocą testu t-Studenta, a istotność statystyczną przedstawiono w następujący sposób: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (D) Całkowity RNA izolowany z komórek HEK WT i HEK UL1 KO rozdzielono w żelu denaturującym i poddano analizie metodą Northern blot. Membrany inkubowano z sondami 5'ETS, ITS1 i ITS2.

Ponadto, sprawdziłam ekspresję przykładowych genów białek rybosomowych, kodujących RPS6 i RPS15, oraz fibrylaryny, w komórkach HEK WT i HEK UL1 KO, zaobserwowałam obniżony poziom wszystkich trzech mRNA (Fig. 9A). Natomiast, nie zaobserwowałam żadnych zmian w poziomie odpowiadających im białek (Fig. 9B). Kiedy przeprowadziłam analizę polisomów w komórkach HEK WT i HEK UL1 KO (rozdział 4.5.9), nie zaobserwowałam również żadnych zmian w profilach rybosomów ani polisomów po wyciszeniu hnRNP UL1 (Fig. 10). Wszystkie te wyniki wskazują, że hnRNP UL1 jest zaangażowany w transkrypcję genów rRNA, ale nie w kolejne etapy biogenezy rybosomów.

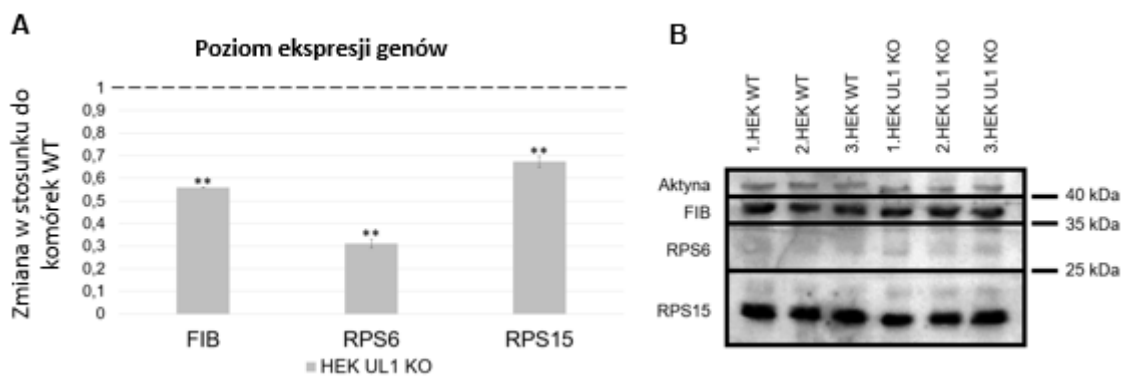


Figura 9. Poziom mRNA i białek rybosomowych (RPS6 i RPS15) oraz fibrylaryny (FIB) w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami HEK WT. (A) Poziomy mRNA białek rybosomowych oraz FIB analizowano metodą RT-qPCR. Słupki błędów przedstawiają wartości SD z trzech powtórzeń biologicznych. Wartości P obliczono za pomocą testu t-Studenta, a istotność statystyczną przedstawiono w następujący sposób: **P \leq 0,01. (B) Analiza metodą western blot połączoną z immunodetekcją z użyciem przeciwciał anti-RPS6, anti-RPS15 i anti-FIB. Aktynę użyto jako kontrolę nałożenia. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych.

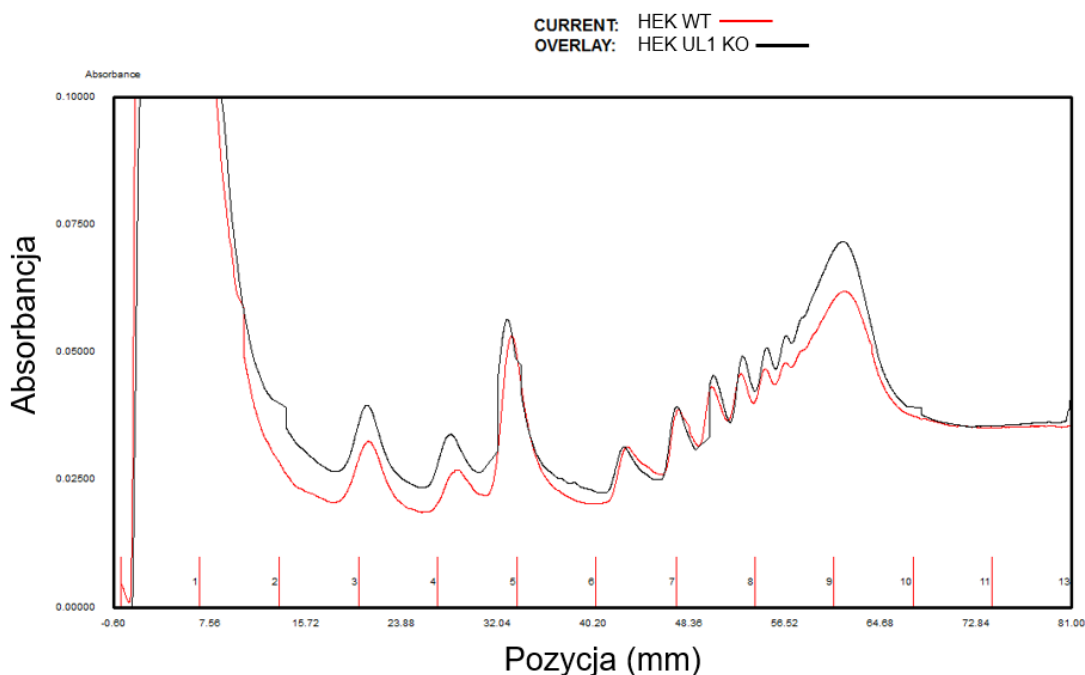


Figura 10. Profilowanie polisomów w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami HEK WT. Nałożono profile absorbancji polisomów wyizolowanych z komórek HEK WT (linia czerwona) i HEK UL1 KO (linia czarna).

5.1.4 Rola hnRNP UL1 w naprawie uszkodzeń rDNA

Obserwacja, że hnRNP UL1 jest zlokalizowany w jąderkach komórkowych skłoniła mnie do postawienia kolejnego pytania, czy białko to angażuje się w naprawę uszkodzeń jąderkowego DNA, podobnie jak uczestniczy w naprawie uszkodzeń jądrowego DNA (Gurunathan i in., 2015). W celu odpowiedzi, najpierw przeanalizowałam poziom markera uszkodzeń DNA, γ H2A.X, w komórkach HEK UL1 KO. Jednak nie zaobserwowałam żadnych istotnych zmian, co wskazuje, że komórki pozbawione hnRNP UL1 nie generują więcej uszkodzeń DNA niż komórki WT (Fig. 11). Następnie, przeanalizowałam kolokalizację obu białek w jąderkach komórkowych w warunkach kontrolnych (DMSO) oraz po traktowaniu odczynnikami genotoksycznymi ETO (10 μ M) i CPT (5 μ M) przez 2,5 h. Dodatkowo, kolokalizację hnRNP UL1 i γ H2A.X badałam w tych samych warunkach w komórkach HeLa FUS KO, aby sprawdzić, czy białko FUS uczestniczy w tej jąderkowej funkcji hnRNP UL1. Wiadomo, że FUS i hnRNP UL1 oddziałują ze sobą i kolokalizują w jądrach komórkowych (Raczyńska i in., 2015). Jak widać na Figurze 12A, B, po uszkodzeniach DNA wywołanych ETO i CPT, białka hnRNP UL1 i γ H2A.X kolokalizowały głównie w jądrze komórkowym, jednak po traktowaniu CPT oba czynniki silnie agregowały również w jąderkach (białe strzałki), zwłaszcza na ich obrzeżach (żółte strzałki). Taka lokalizacja białek po indukcji uszkodzeń DNA sugeruje ich udział w naprawie podwójnych uszkodzeń DNA i rekrutacji do czapeczek jąderkowych. Co ciekawe, w komórkach HeLa FUS KO nie zaobserwowałam wyraźnych różnic w porównaniu z komórkami HeLa WT (Fig. 12B), co wskazuje na to, że wyciszenie FUS nie wpływa na lokalizację hnRNP UL1 w jąderkach komórkowych.

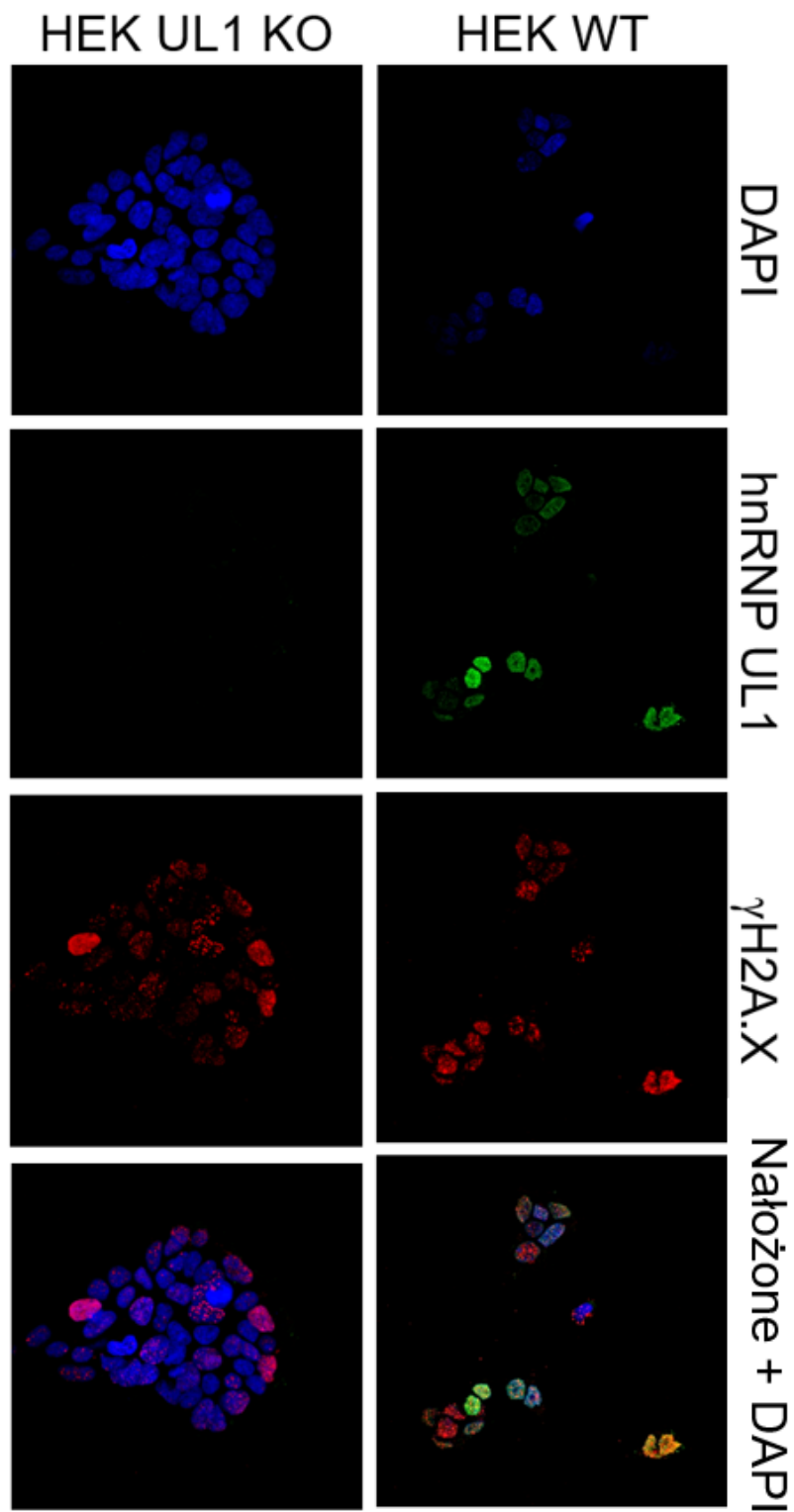


Figura 11. Badanie poziomu γ H2A.X w komórkach HEK WT i HEK UL1 KO. Komórki barwiono przy użyciu przeciwciał anti- γ H2A.X i anti-hnRNP UL1. Do barwienia jąder użyto DAPI.

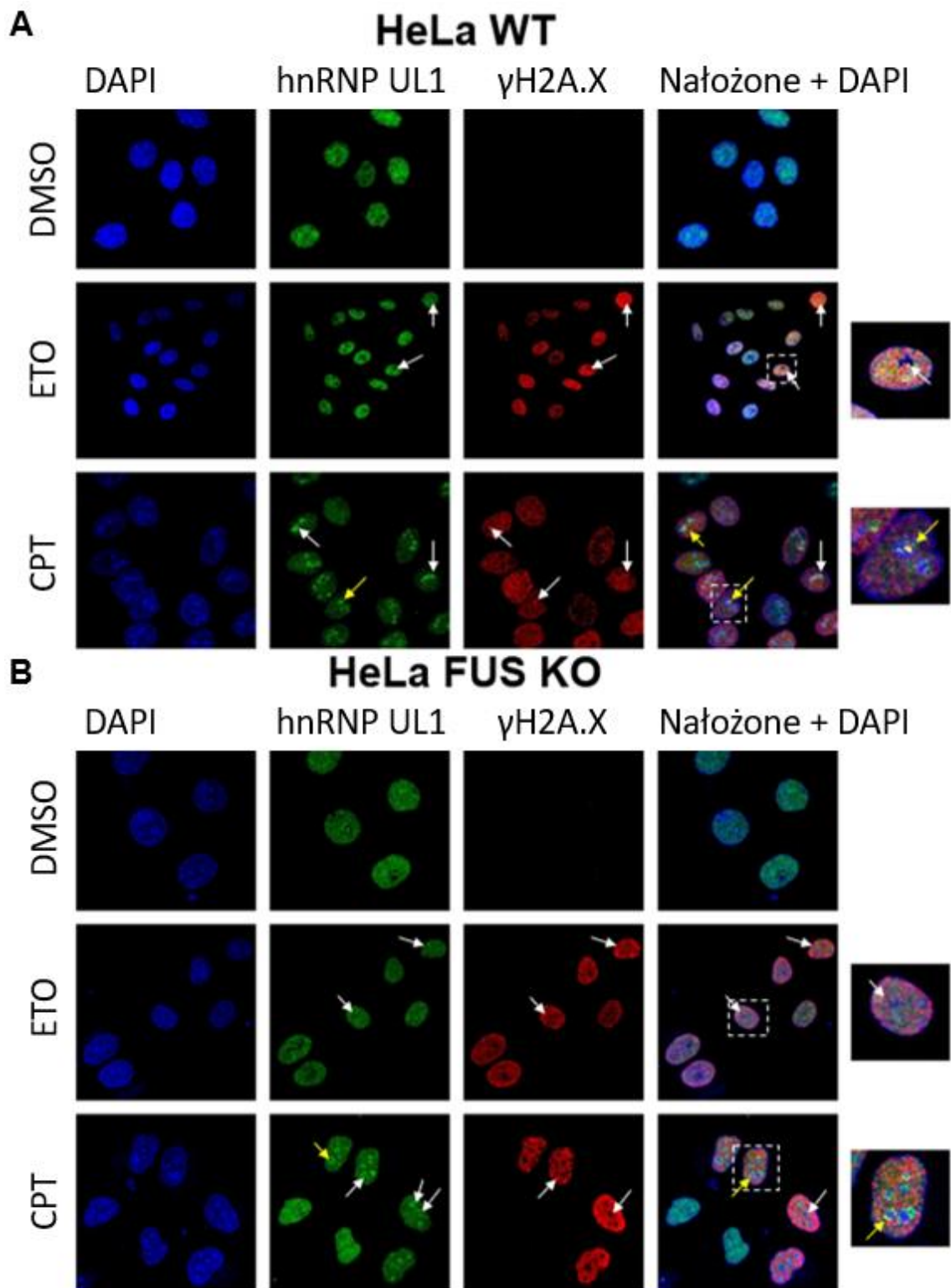


Figura 12. Kolokalizacja hnRNP UL1 i γ H2A.X po indukcji uszkodzeń DNA. (A, B) Barwienie immunologiczne przy użyciu przeciwciał anti- γ H2A.X i anti-hnRNP UL1 w komórkach HeLa WT (A) i HeLa FUS KO (B), traktowanych ETO i CPT. Jako kontroli użyto komórek traktowanych DMSO. Przykładowe miejsca kolokalizacji oznaczono

białymi strzałkami, a agregaty na obrzeżach jąder – żółtymi strzałkami. Do barwienia jąder użyto DAPI.

Następnie, sprawdziłam czy wyciszenie hnRNP UL1 zwiększa wrażliwość komórek na uszkodzenia DNA. W tym celu porównałam przeżywalność komórek HEK WT i HEK UL1 KO po indukcji uszkodzeń DNA przez ETO i CPT. Jak przedstawia Fig. 13A, komórki z delecją hnRNP UL1 były bardziej wrażliwe na oba odczynniki niż komórki WT, osiągając punkt minimalnej przeżywalności i wykazując największą różnicę po 24-30 h. Po tym czasie wrażliwość obu rodzajów komórek stała się ponownie porównywalna. Wynik ten sugeruje, że komórki HEK UL1 KO wykazują zwiększoną wrażliwość na uszkodzenia DNA i potencjalnie spowolniony proces naprawy, co wskazuje na rolę hnRNP UL1 w naprawie uszkodzeń DNA i integralności genomu.

W innym podejściu przeprowadziłam test kometowy, aby zmierzyć uszkodzenia DNA, wywołane przez ETO i CPT w komórkach HEK WT i HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami traktowanymi DMSO. Do obliczeń wykorzystałam dwa parametry: % ogona DNA (ang. *tail DNA%*) i moment ogona (ang. *tail moment*), które są wskaźnikami uszkodzeń DNA, i pozwalają ocenić migrację materiału genetycznego do tzw. „ogona”. Jak widać na Figurze 13B, wśród komórek poddanych działaniu zarówno ETO, jak i CPT, ogony komet były dłuższe w komórkach HEK UL1 KO niż w komórkach HEK WT, co potwierdziły również pomiary. Obserwacja ta potwierdza, że komórki z wyciszeniem hnRNP UL1 wykazują zwiększoną podatność na uszkodzenia DNA.

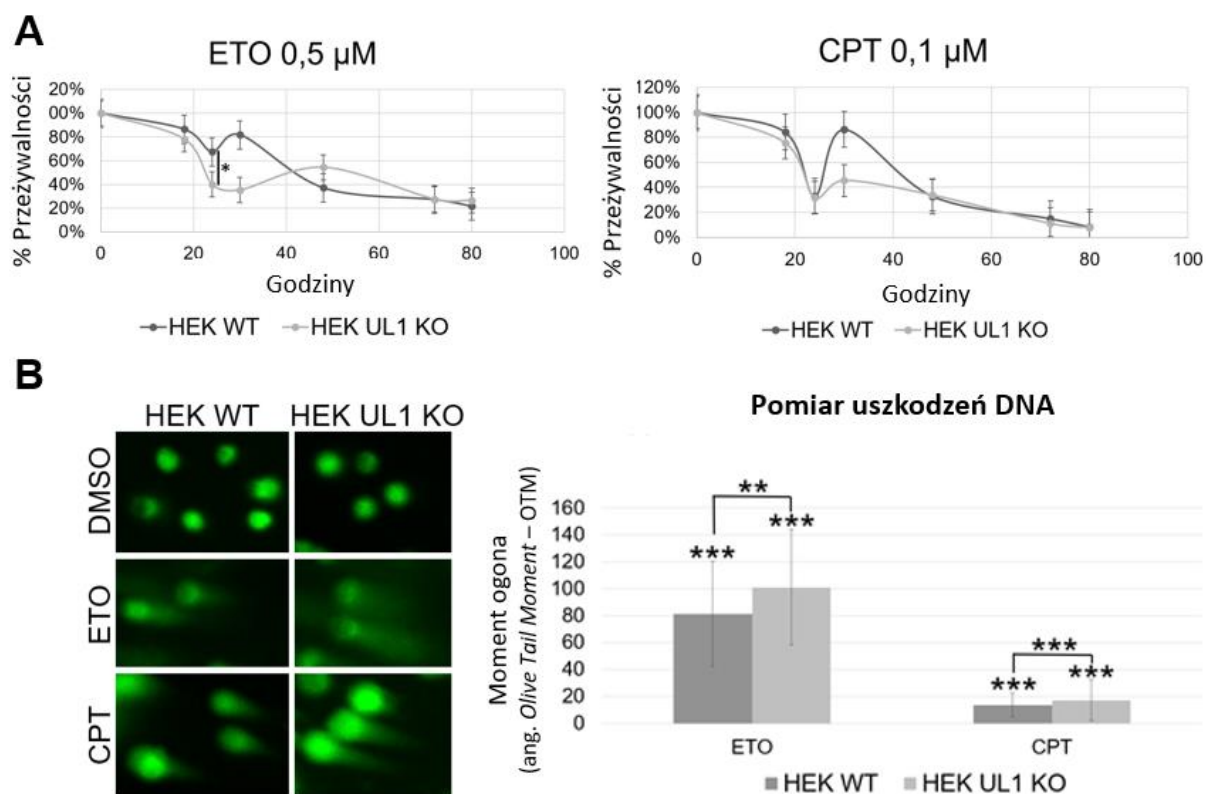


Figura 13. Udział hnRNP UL1 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) w jąderkach komórkowych. (A) Ocena wrażliwość komórek HEK UL1 KO na uszkodzenia DNA w porównaniu z komórkami HEK WT po traktowaniu ETO i CPT. (B) Uszkodzenia DNA oceniano testem kometowym w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami HEK WT, po indukcji uszkodzeń DNA za pomocą ETO i CPT. Komórki traktowane DMSO wykorzystano jako kontrolę negatywną. Analizie poddano 50 komórek z każdej próby. Słupki błędów przedstawiają wartości SD z trzech powtórzeń biologicznych. Wartości P obliczono za pomocą testu t-Studenta, a istotność statystyczną przedstawiono w następujący sposób: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Ponadto, aby przybliżyć rolę hnRNP UL1 w naprawie jąderkowego DNA, sprawdziłam jego oddziaływanie z białkami, których funkcja w szlaku naprawy uszkodzeń DNA została już opisana: γ H2A.X, Chk1, RPA32, 53BP1, RAD50, XRCC1 (Feijoo i in., 2001; He i in., 1995; Lee i Paull, 2004; Paull i in., 2000; Wang i in., 2002; Whitehouse i in., 2001).

Najpierw przeprowadziłam eksperyment IP z użyciem przeciwciała anti-hnRNP UL1, na frakcji NO i CN komórek HEK WT, a następnie analizę western blot i immunodetekcję z użyciem przeciwciał anti-hnRNP UL1, anti-pChk1 i anti-pRPA32. Jak już wspomniałam we wstępie pracy, białko RPA32 jest częścią kompleksu RPA,

który rozpoznaje jednoniciowe pęknięcia DNA i jest jednym z głównych kompleksów uczestniczących w szlaku naprawy DNA zarówno w jądrze, jak i w jąderku komórkowym. Kinaza Chk1 odgrywa ważną rolę działając w punkcie kontrolnym cyklu komórkowego i bierze udział w zatrzymaniu cyklu komórkowego po uszkodzeniu DNA. Jak widać na Fig. 14A, oba białka oddziałują z hnRNP UL1, zarówno we frakcji NO, jak i frakcji CN komórek HEK WT.

Kolejne analizy w celu doprecyzowania, w którym szlaku DDR uczestniczy białko hnRNP UL1, przeprowadziłam na liniach komórkowych HEK293 ze stabilną ekspresją FLAG-hnRNP UL1 – linia HEK UL1 OE. Linie zostały przygotowane przy użyciu systemu MultiMam™ Stable i linii komórkowych HEK293 Flp-In™-293 (Life Tech) (rozdział 4.1.5). IP wykonałam z użyciem przeciwciał anti-FLAG a następnie analizowałam obecność białek 53BP1, RAD50 i XRCC1 we frakcji immunoprecypitowanej. Białko 53BP1 jest zaangażowane w sygnalizację i naprawę podwójnych uszkodzeń DNA w komórkach ludzkich; RAD50 należy do kompleksu MRN, uczestniczącego w naprawie podwójnych uszkodzeń DNA; a XRCC1 uczestniczy w naprawie jednoniciowych pęknięć DNA poprzez pośredniczenie w tworzeniu kompleksów białkowych naprawiających uszkodzenia DNA. Jak widać na Fig. 14B, w tym eksperymencie zaobserwowałam jedynie słabe oddziaływanie hnRNP UL1 z XRCC1 we frakcji NO. Jednakże, immunofluorescencja z użyciem przeciwciał anti-hnRNP UL1 i anti-XRCC1 wykonana w komórkach HEK WT po indukcji uszkodzeń DNA, nie potwierdziła kolokalizacji tego białka z hnRNP UL1 w jąderkach komórkowych (Fig. 15A). Ponadto, w tym eksperymencie zaobserwowałam również bardzo słabą kolokalizację hnRNP UL1 z 53BP1, RAD50 i RPA32 w jąderkach komórkowych (Fig. 15B-D).

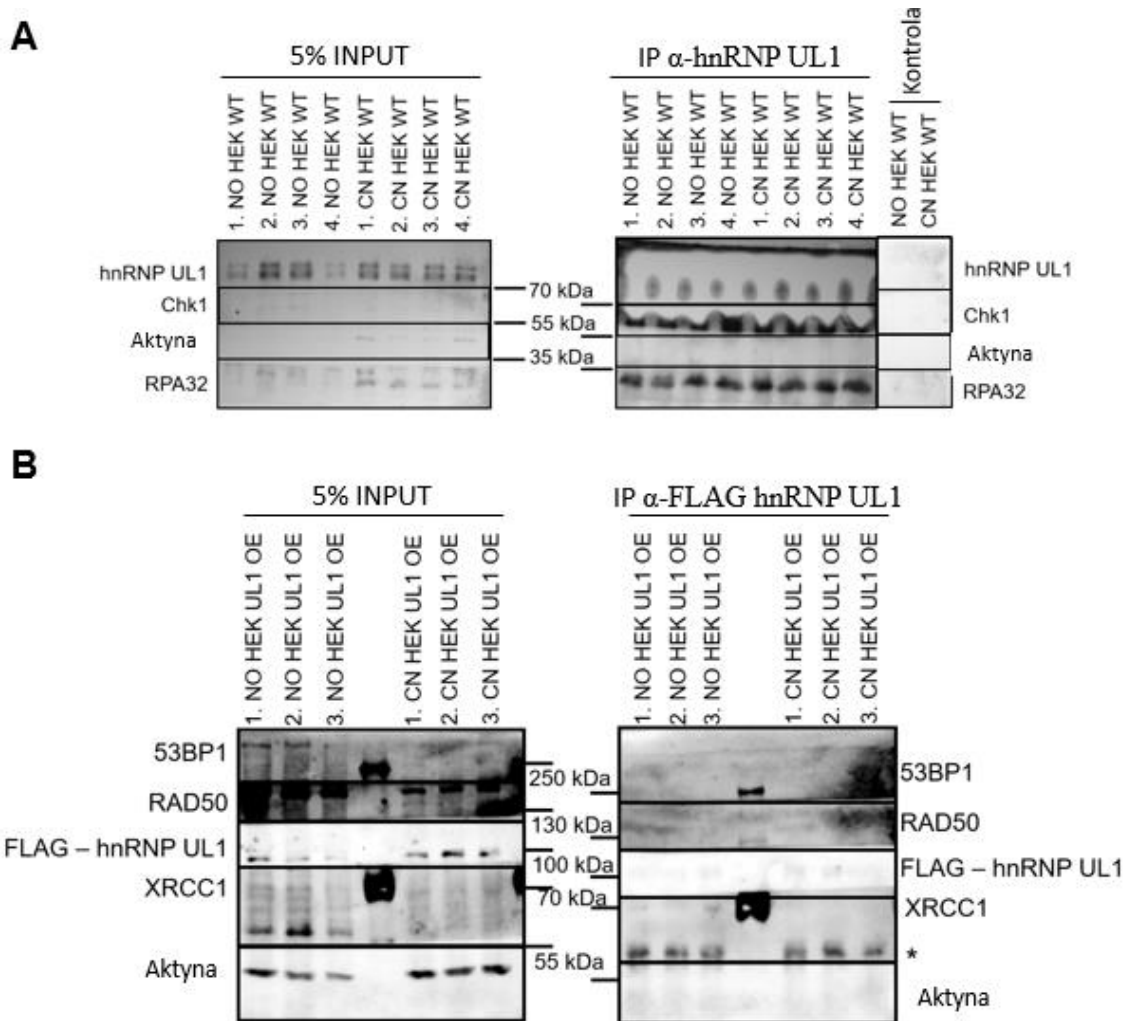
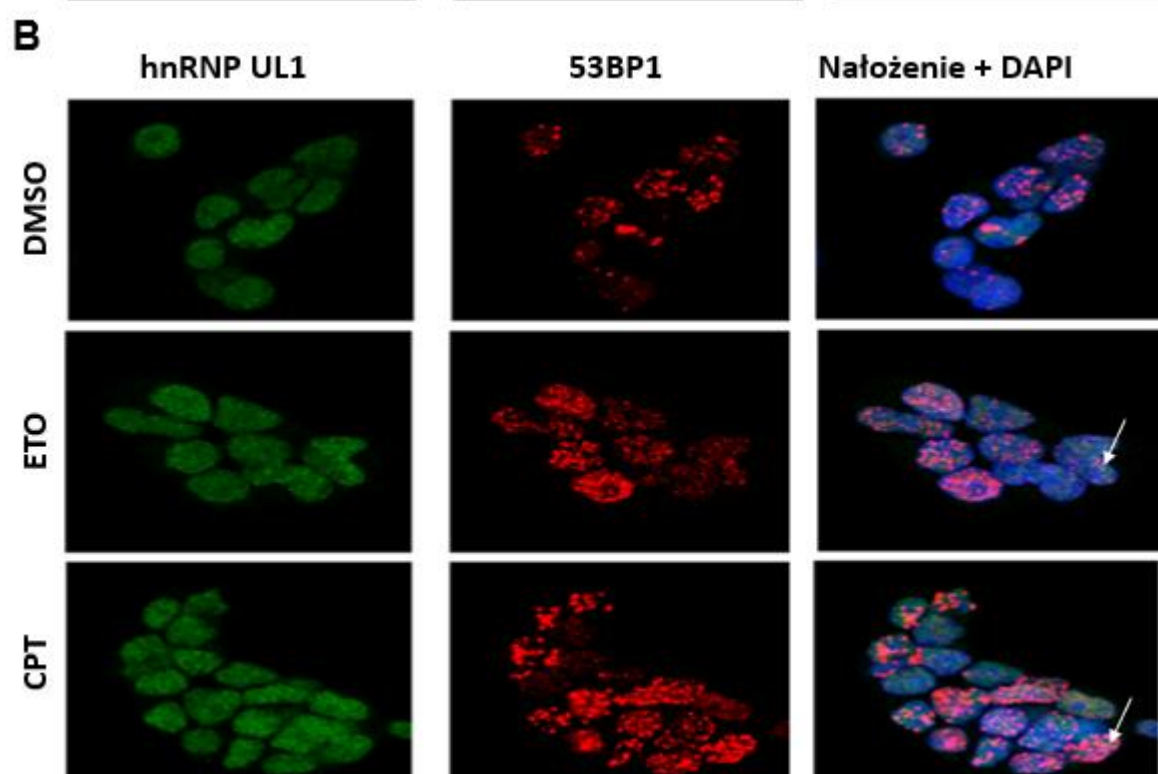
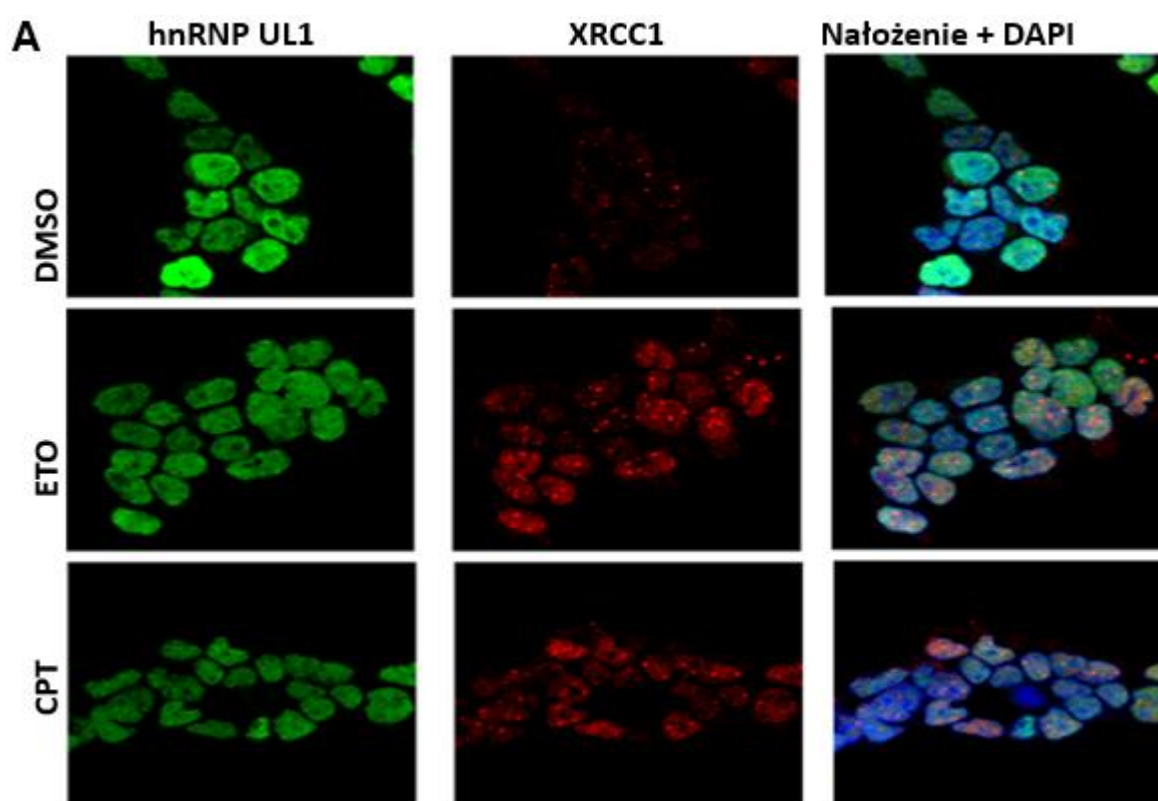


Figura 14. Oddziaływanie hnRNP UL1 z białkami zaangażowanymi w lokalizację uszkodzeń i naprawę DNA. (A) IP przeprowadzono z użyciem przeciwciała anti-hnRNP UL1 i ekstraktów białkowych z frakcji NO i CN komórek HEK WT. Białka identyfikowano metodą western blot połączoną z immunodetekcją z użyciem przeciwciał anti-hnRNP UL1, anti-pChk1 i anti-PRPA32. Do eksperymentu użyto czterech niezależnych powtórzeń biologicznych z każdej frakcji. Input stanowił 5% całkowitej objętości ekstraktów białkowych użytych w eksperymencie; do kontroli negatywnej użyto kulek magnetycznych bez przeciwciał. (B) IP z przeciwciałem anti-FLAG na ekstraktach białkowych z frakcji NO i CN komórek HEK UL1 OE. Do eksperymentu użyto trzech niezależnych powtórzeń biologicznych z każdej frakcji. Input stanowił 5% całkowitej objętości ekstraktów białkowych użytych w eksperymencie; do kontroli negatywnej użyto kulek magnetycznych bez przeciwciał. Do barwienia immunologicznego użyto przeciwciał anti-53BP1, anti-RAD50, anti-FLAG i anti-XRCC1. Aktyna została użyta jako kontrola nałożenia. * - sygnał niespecyficzny.



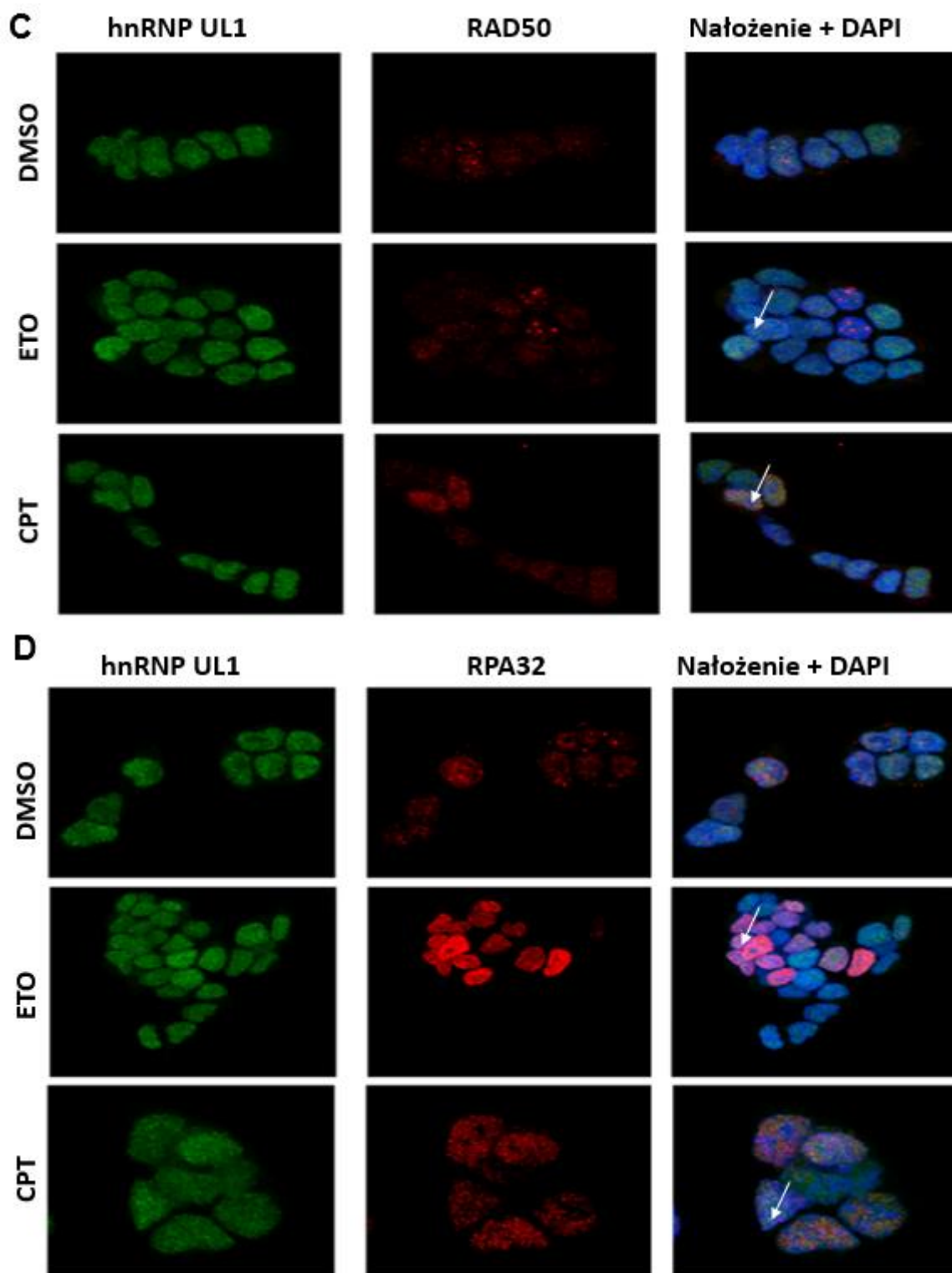


Figura 15. Kolokalizacja hnRNP UL1 ze znanymi markerami DDR w komórkach HEK WT, po indukcji uszkodzeń DNA przez ETO i CPT. Użyto przeciwciał: (A) anty-hnRNP UL1 i anty-XRCC1; (B) anty-hnRNP UL1 i anty53BP1; (C) anty-hnRNP UL1 i anty-RAD50; (D) anty-hnRNP UL1 i anty-RPA32. Komórki traktowane DMSO użyto jako kontrola negatywna. Do barwienia jąder użyto DAPI.

Podsumowując tę część badań, wykazałam, że:

- Białko hnRNP UL1 zostało zlokalizowane w jąderkach komórek ludzkich;
- białko hnRNP UL1 stymuluje transkrypcję genów rRNA;
- komórki HEK UL1 KO były bardziej wrażliwe na uszkodzenia DNA;
- białko hnRNP UL1 oddziałuje z białkami lokalizacji i naprawy uszkodzeń DNA: γ H2A.X, RPA32, XRCC1 i Chk1 w jąderkach komórek ludzkich, co sugeruje jego udział w naprawie uszkodzeń DNA;

5.2. Rola hnRNP UL1, U7 snRNP i FUS w regulacji ekspresji genów histonowych

Druga ścieżka badawcza, w której uczestniczyłam podczas realizacji niemiejszej rozprawy doktorskiej, dotyczyła wyjaśnienia roli białka hnRNP UL1 i FUS oraz cząstki U7 snRNP w hamowaniu ekspresji genów histonów zależnych od replikacji poza fazą S cyklu komórkowego. Aby sprawdzić tę hipotezę, przeprowadziłam serię eksperymentów opisanych poniżej.

5.2.1 Analiza poziomu hnRNP UL1 w fazach cyklu komórkowego

Na początku zoptymalizowałam protokół do synchronizacji komórek HEK WT i HEK UL1 KO (rozdział 4.1.7) i sprawdziłam wydajność synchronizacji do poszczególnych faz cyklu komórkowego na cytometrze przepływowym Guava® easyCyte™. Synchronizację komórek przeprowadziłam w celu wykonania kilku eksperymentów opisanych poniżej, między innymi do sprawdzenia poziomu białka hnRNP UL1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego komórek dzikich, czy poziomu ekspresji genów histonowych w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w warunkach wyciszenia hnRNP UL1. Wynik synchronizacji dla linii WT przedstawia figura 16., podobną wydajność synchronizacji uzyskałam dla linii komórkowych HEK UL1 KO.

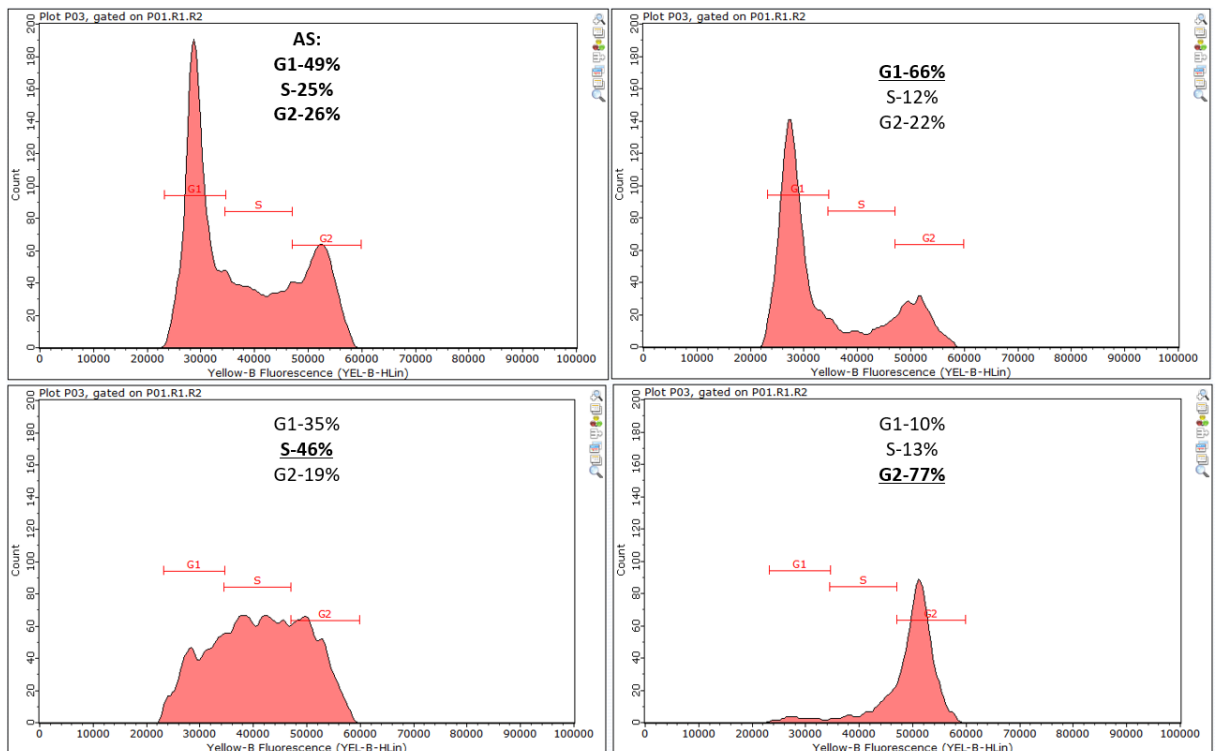


Figura 16. Synchronizacja komórek HEK WT z zastosowaniem bloku nokodazolowego. Komórki wybarwiano jodkiem propidyny i analizowano w cytometrze przepływowym. Na wykresach przedstawiono odsetek procentowy komórek w fazach G1, S i G2, w asynchronicznych komórkach HEK WT (AS) i komórkach zsynchronizowanych do faz G1, S i G2 (odpowiednio podkreślonych na wykresach).

Aby sprawdzić poziom białka hnRNP UL1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, po optymalizacji protokołu zsynchronizowałam komórki HEK WT do faz G1, S i G2, a następnie z zebranych komórek wyizolowałam ekstrakty białkowe (rozdział 4.5.1). 30 μ g mieszaniny białek rozdzieliłam w żelu poliakryloamidowym, następnie przenieśliam na membranę metodą western blot i identyfikowałam metodą immunodetekcji (rozdział 4.5.6) z użyciem przeciwciał anti-hnRNP UL1 i anti-Aktyna (rozdział 3.7.). Jak widać na figurze 17., poziom białka hnRNP UL1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego względem komórek asynchronicznych wygląda następująco: w fazie G1 - 1,05, w fazie G2 - 0,6, w fazie S - 0,7. Pomiar intensywności prążków wykonałam w programie MultiGauge, normalizację prowadziłam względem aktyny. Wynik eksperymentu wskazuje, że białko hnRNP UL1 występuje w największej ilości w fazie G1 cyklu komórkowego.

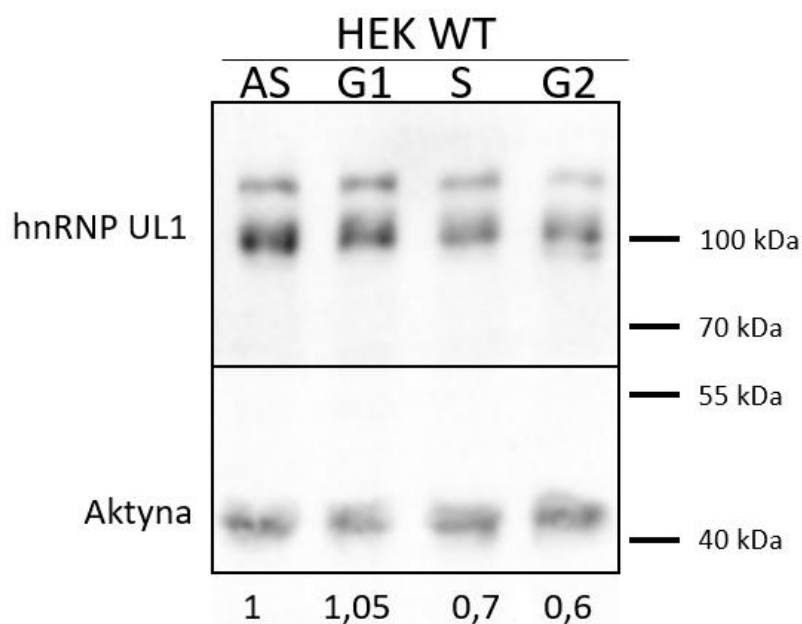


Figura 17. Analiza poziomu białka hnRNP UL1 w fazach cyklu komórkowego: G1, S oraz G2, metodą western blot połączoną z immunodetekcją z użyciem przeciwciał anti-hnRNP UL1 i anti-Aktyna. Aktyna oraz ekstrakt białkowy z komórek asynchronicznych (AS) zostały użyte jako kontrole nałożenia.

5.2.2 Analiza poziomu białka FUS i U7 snRNA w liniach HEK UL1 KO oraz poziomu białka hnRNP UL1 w liniach HeLa FUS KO

Poziom obu białek, FUS i hnRNP UL1, sprawdziłam odpowiednio, w liniach HEK UL1 KO oraz HeLa FUS KO, względem linii HEK WT oraz HeLa WT, metodą western blot połączoną z immunodetekcją (rozdział 4.5.6) z użyciem przeciwciał anti-FUS i anti-hnRNP UL1. Wynik eksperymentu widoczny na figurze 18. wskazuje, że poziom białka FUS jest obniżony w linii HEK UL1 KO (0,4), natomiast poziom białka hnRNP UL1 jest nieco podwyższony w linii HeLa FUS KO (1,48) (Fig. 18A-B). W przypadku U7 snRNA, nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic w poziomie tej cząsteczki w liniach HEK UL1 KO, co świadczy o tym, że hnRNP UL1 nie jest czynnikiem regulującym poziom U7 snRNA (Fig. 18C). Natomiast według publikacji Raczyńska i in., 2015, zaobserwowano spadek poziomu U7 snRNA w liniach komórkowych po wyciszeniu białka FUS, co może wynikać z udziału białka FUS w biogenezie cząstek snRNP (Gerbino i in., 2013).

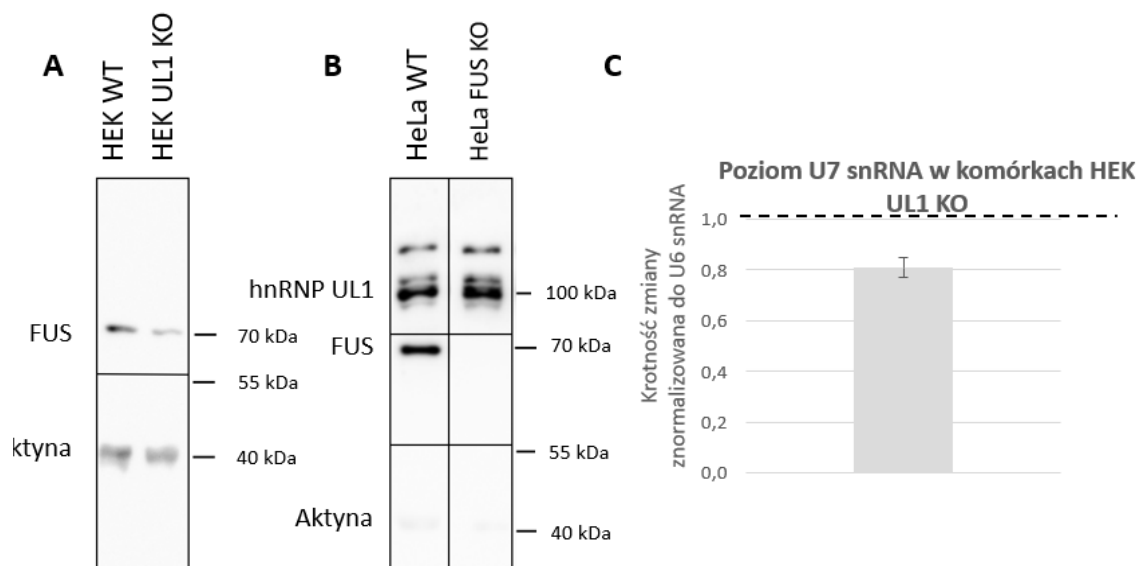


Figura 18. Wpływ wyciszenia badanych białek na poziom FUS, hnRNP UL1 oraz U7 snRNA. (A) Poziom białka FUS w linii HEK UL1 KO oraz (B) poziom białka hnRNP UL1 w linii HeLa FUS KO sprawdzono metodą western blot połączoną z immunodetekcją. Aktynę użyto jako kontrolę nałożenia. (C) Poziom ekspresji U7 snRNA w komórkach HEK UL1 KO, znormalizowany do poziomu U6 snRNA. Słupki błędów przedstawia wartości SD z trzech powtórzeń biologicznych.

5.2.3 Analiza wzajemnych oddziaływań FUS i hnRNP UL1

Następnie, przeprowadziłam analizę wzajemnych interakcji FUS i hnRNP UL1. W tym celu dr Agata Stępień wykonała analizę oddziaływań FUS i hnRNP UL1 *in vivo*, metodą PLA (rozdział 4.6.4), którą przeprowadziła w komórkach HeLa asynchronicznych (AS) i komórkach zsynchronizowanych do faz cyklu komórkowego: G1, S i G2. Najsilniejszą interakcję pomiędzy FUS i hnRNP UL1 zaobserwowaliśmy w fazie G1 cyklu komórkowego (Fig. 19). Wynik ten jest zgodny z rezultatami naszej grupy, opublikowanymi w Raczyńska i in., 2015, gdzie w eksperymencie immunoprecypitacji zaobserwowano najsilniejsze oddziaływanie białek FUS i hnRNP UL1 w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego. Wyniki te sugerują, że oba białka mogą współdziałać w fazie G1 w inhibicji ekspresji genów histonów zależnych od replikacji.

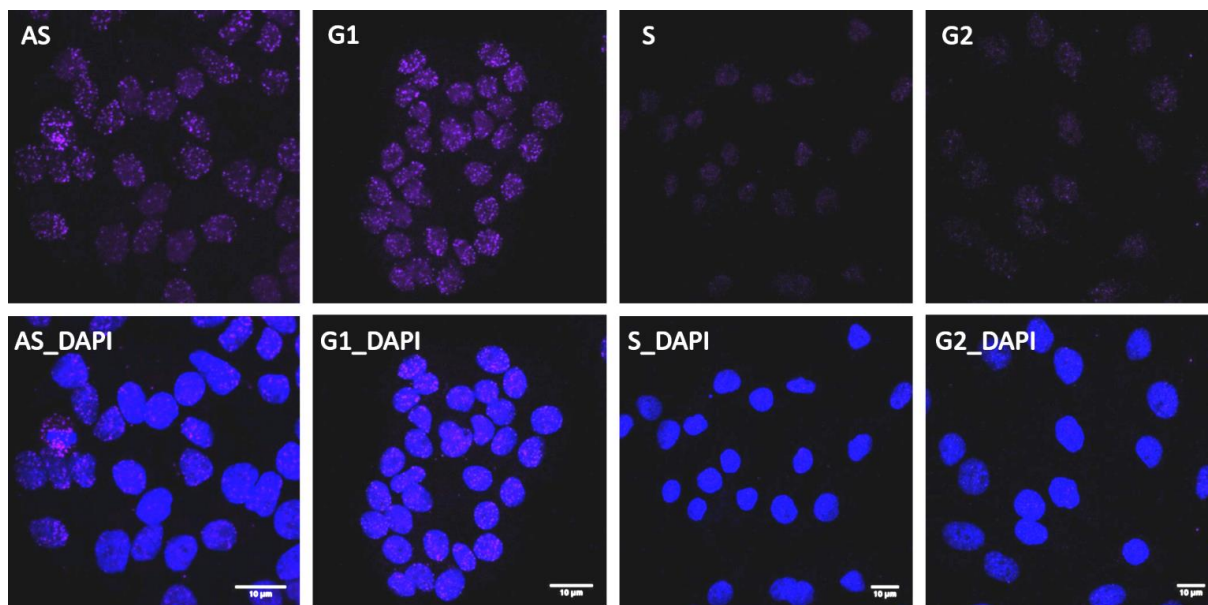


Figura 19. Analiza oddziaływania białka FUS i hnRNP UL1 w fazach cyklu komórkowego metodą PLA, w komórkach HeLa AS oraz zsynchronizowanych do faz G1, S i G2. Górny panel przedstawia wyniki PLA z przeciwciałami anti-FUS i anti-hnRNP UL1, dolny panel przedstawia nałożenie DAPI z PLA. Eksperyment wykonała dr Agata Stępień.

W dalszej części projektu postanowiłam ustalić, która domena FUS jest niezbędna do interakcji z hnRNP UL1. W tym celu wykonałam transfekcję przejściową komórek HeLa FUS KO (z użyciem odczynnika X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, rozdział 4.1.6) konstruktami do nadekspresji wariantów białka FUS z dołączoną metką FLAG, opisanymi w rozdziale 3.6., a następnie przeprowadziłam IP z użyciem przeciwciał anti FLAG. Zaobserwowałam, że białko hnRNP UL1 nie oddziałuje tylko z fragmentem białka FUS pozbawionym końca C (Fig. 20), co sugeruje, że właśnie koniec C białka FUS jest niezbędny do interakcji z hnRNP UL1.

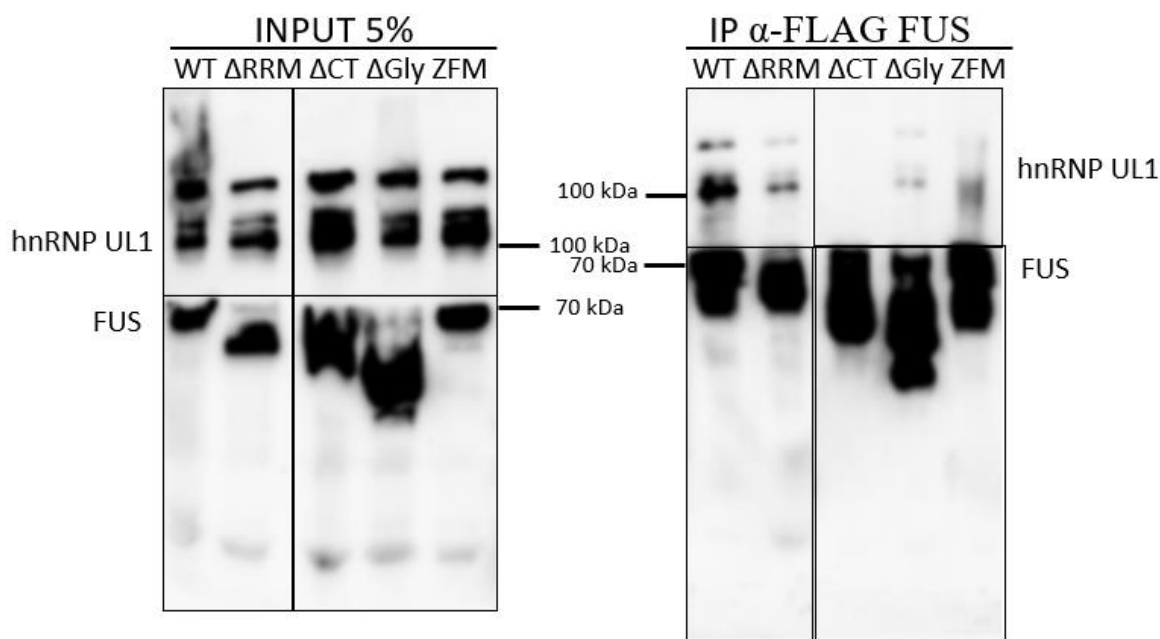


Figura 20. Identyfikacja domeny FUS wymaganej do interakcji z hnRNP UL1. Eksperyment IP przeprowadzono na kuleczkach magnetycznych skoniungowanych z metką-FLAG. Białka identyfikowano metodą western blot połączoną z immunodetekcją, użyto przeciwciała anti-hnRNP UL1 i anti-FLAG. Δ CT - FUS bez końca C; Δ RRM - FUS bez motywów RRM; Δ Gly - FUS bez motywu bogatego w Gly; ZFM - FUS z mutacjami punktowymi w obrębie motywu palca cynkowego. INPUT stanowił 5% całkowitej objętości ekstraktu użytego do eksperymentu.

5.2.4 Badanie poziomu modyfikacji potranslacyjnych białka hnRNP UL1 i ich wpływu na oddziaływanie z białkiem FUS

W fazie S cyklu komórkowego, białko FUS aktywuje zależną od replikacji ekspresję genów histonowych, a poza tą fazą może pełnić rolę inhibitora, działając w kompleksie z innymi białkami, np. hnRNP UL1 (Raczyńska i in., 2015). W celu określenia, w jaki sposób te dwie przeciwstawne funkcje FUS mogą być przełączane podczas cyklu komórkowego, sprawdziłam czy modyfikacje potranslacyjne białka hnRNP UL1 są zależne od cyklu komórkowego i czy mogą wpływać na oddziaływanie z białkiem FUS. Najpierw, przeanalizowałam status fosforylacji hnRNP UL1 w cyklu komórkowym z użyciem systemu Phos-tag™ (rozdział 4.5.8). Jak widać na figurze 21., w fazach G1 i G2 cyklu komórkowego zaobserwowałam głównie fosforylowaną formę białka (prążek migrujący wolniej), natomiast w fazie S widoczne są obie formy białka, zarówno fosforylowana, jak i defosforylowana (Fig. 21). Tak więc, status fosforylacji

białka hnRNP UL1 wydaje się być regulowany w cyklu komórkowym. Biorąc pod uwagę poprzednie wyniki, wskazujące na silniejsze oddziaływanie hnRNP UL1 z FUS w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego, sugeruję, że to fosforylowana forma białka hnRNP UL1 wchodzi w interakcje z FUS.

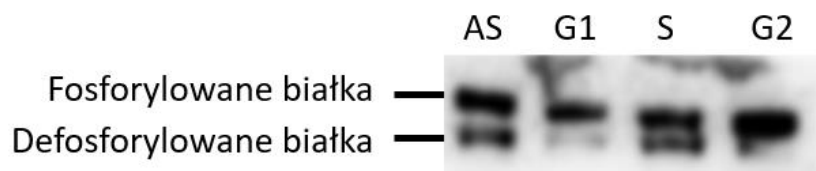


Figura 21. Fosforylowana/defosforylowana forma białka hnRNP UL1 w różnych fazach cyklu komórkowego. Użyto odczynnika Phos-taq™, który łącząc się z grupami fosforanowymi, spowalnia migrację fosforylowanych form białka w żelu PAA. Wynik migracji analizowano techniką western blot połączoną z immunodetekcją z użyciem przeciwciała anty- hnRNP UL1.

Ponadto, sprawdziłam również, czy metylacja reszt argininowych w białku hnRNP UL1 jest niezbędna do interakcji z FUS. Komórki HeLa transfekowałam przejściowo (z użyciem odczynnika Viromer®RED, rozdział 4.1.6) plazmidem kodującym zmutowaną wersję białka hnRNP UL1 – UL1.RK (rozdział 3.6), gdzie argininy w motywie RGG/RG zastąpiono lizyną. Następnie, przeprowadziłam IP na kuleczkach magnetycznych skoniugowanych z przeciwciałem anty-hnRNP UL1, wynik analizowałam techniką western blot połączoną z immunodetekcją, używając przeciwciał anty-hnRNP UL1 oraz anty-FUS. Wynik eksperymentu wskazuje, że brak metylacji w domenie RGG/RG białka hnRNP UL1 nie zaburza interakcji z FUS (Fig. 22).

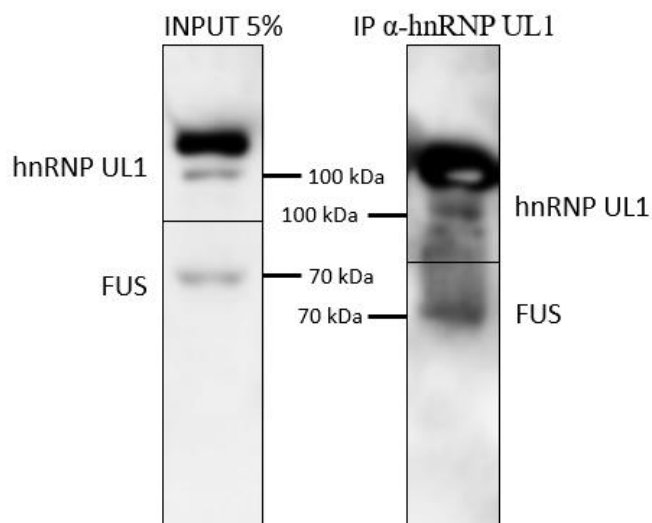


Figura 22. Wpływ metylacji argininy w hnRNP UL1 na oddziaływanie z białkiem FUS. IP przeprowadzono z użyciem ekstraktu białkowego z asynchronicznych komórek HeLa po transfekcji przejściowej plazmidem z mutacjami hnRNP UL1 – UL1.RK. Wynik analizowano techniką western blot połączoną z immunodetekcją z wykorzystaniem przeciwciał anti-hnRNP UL1 i anti-FUS. INPUT stanowił 5% całkowitej objętości ekstraktu białkowego użytego do IP.

5.2.5 Analiza interakcji FUS i hnRNP UL1 z U7 snRNA w liniach HeLa FUS KO i HEK UL1 KO

Następnie, przeanalizowałam interakcje białek hnRNP UL1 i FUS z cząsteczką U7 snRNA, w komórkach, odpowiednio, HeLa FUS KO i HEK UL1 KO, względem komórek typu dzikiego. Wykonałam immunoprecypitację RNA (RIP) z użyciem przeciwciał anti-FUS i anti-hnRNP UL1 (rozdział 4.5.3). Wynik eksperymentu wskazuje, że gdy ekspresja genu *HNRNPUL1* jest wyciszona, FUS silniej wiąże U7 snRNA. Podobnie, hnRNP UL1 wiąże silniej U7 snRNA w komórkach z wyciszeniem ekspresji genu *FUS* (Fig. 23). Sugeruje to, że oba białka mogą konkurować o wiązanie z U7 snRNA w komórce. Jednakże należy pamiętać, że zgodnie z wynikiem eksperymentu opisanego w rozdziale 5.2.2, Fig. 18., poziom białka FUS jest obniżony w komórkach HEK UL1 KO, podczas gdy poziom białka hnRNP UL1 jest podwyższony w komórkach HeLa FUS KO. Zmiana zaobserwowana na figurze 23. jest więc wypadkową wiązania U7 snRNA i różnicy w poziomie obu białek, FUS i hnRNP UL1, wynikających z braku, odpowiednio, hnRNP UL1 i FUS w komórkach.

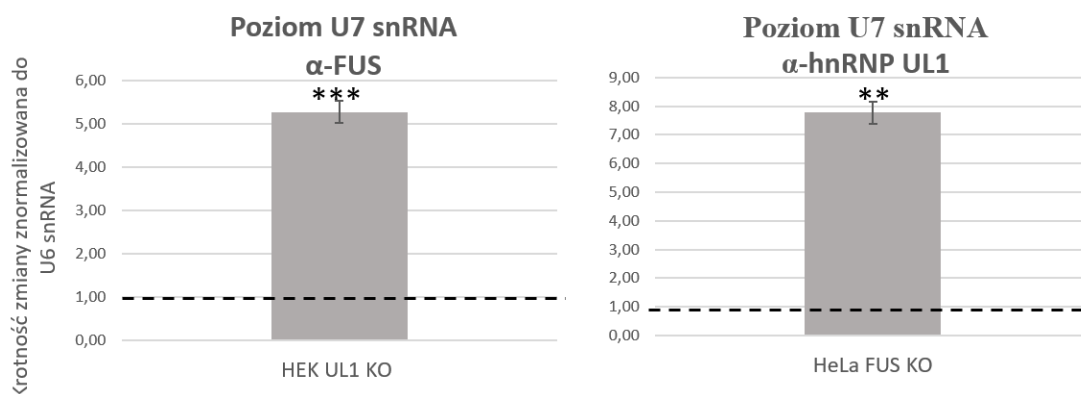


Figura 23. Oddziaływanie białek FUS i hnRNP UL1 z cząsteczką U7 snRNA. Poziom U7 snRNA analizowano metodą RT-qPCR po eksperymencie RIP w komórkach HEK UL1 KO i HeLa FUS KO względem komórek dzikich, z użyciem przeciwciał, odpowiednio, anti-FUS i anti-hnRNP UL1. Słupki błędów przedstawiają wartości SD z trzech powtórzeń biologicznych. Wartości P obliczono za pomocą testu t-Studenta, a istotność statystyczną przedstawiono w następujący sposób: ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

5.2.6 Analiza ekspresji genów histonów zależnych od replikacji

Kolejnym etapem było sprawdzenie czy białko hnRNP UL1 wpływa na transkrypcję genów histonów zależnych od replikacji oraz czy hamuje ekspresję genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego.

Aby odpowiedzieć na to pytanie, sprawdziłam poziom ekspresji wybranych genów histonów zależnych od replikacji: *HIST1H2BC*, *HIST2H2AC* i *HIST1H2BJ*, w synchronizowanych komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z synchronizowanymi komórkami typu dzikiego, techniką RT-qPCR (rozdział 4.3.4). Pary staterów zaprojektowano w taki sposób, aby analizować i porównać poziom wszystkich transkryptów z poziomem transkryptów niewłaściwie przeciętych (wydłużonych, poliadenylowanych) (Raczyńska i in., 2015). Takie podejście pozwoliło zbadać jednocześnie wpływ hnRNP UL1 na transkrypcję genów histonowych i dojrzewanie końca 3' ich pre-mRNA. Próby normalizowano do poziomu wszystkich i przyciętych transkryptów histonu H2A.Z, który jest poliadenylowany i którego ekspresja nie jest regulowana w cyklu komórkowym ani nie zależy od U7 snRNP.

Zgodnie z oczekiwaniami, w komórkach HEK WT zależna od replikacji ekspresja genów histonowych wzrasta w fazie S cyklu komórkowego w porównaniu z fazą G1 i G2. W fazie S zaobserwowałam zarówno podwyższony poziom wszystkich transkryptów

(Fig. 24A) jak i niższy poziom niewłaściwie procesowanych, wydłużonych transkryptów (Fig. 24B). Natomiast, po wyciszeniu genu *HNRNPUL1*, różnice w transkrypcji i dojrzewaniu końca 3' pre-mRNA pomiędzy fazami cyklu komórkowego są bardziej znaczące. Ekspresja genów histonowych również wzrasta w fazie S cyklu komórkowego, ale ten wzrost jest silniejszy niż w komórkach HEK WT. Z kolei, poziom transkryptów w fazie G2 był obniżony w komórkach HEK UL1 KO, podczas gdy w fazie G1 nie zaobserwowałam znaczących różnic między linią WT i KO. W analizie niewłaściwie procesowanych transkryptów zaobserwowałam, że ich poziom w komórkach HEK UL1 KO maleje w fazie S w stopniu podobnym jak w komórkach typu dzikiego; natomiast w fazie G2 zmiana ta jest nawet większa, zwłaszcza w przypadku transkryptów histonu H2BC i H2AC (Fig. 24B). Uzyskane wyniki wskazują, że podobnie jak białko PC4 (Brzęk i in., 2018), hnRNP UL1 wpływa na zahamowanie ekspresji genów histonów zależnych od replikacji, ale tylko w fazie S cyklu komórkowego; transkrypcja tych genów w fazie S jest wydajniejsza po wyciszeniu białka. Nie zauważyliśmy natomiast istotnych różnic w poziomie transkryptów w fazie G1 cyklu komórkowego, w komórkach HEK UL1 KO w porównaniu z komórkami kontrolnymi HEK WT.

Pierwotna hipoteza badawcza, która zakładała, że białko hnRNP UL1 wraz z białkiem FUS oraz cząstką U7 snRNP może mieć wpływ na inhibicję ekspresji genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego, nie została potwierdzona. Według moich obserwacji, w komórkach po wyciszeniu hnRNP UL1 różnice w poziomie transkrypcji genów histonów zależnych od replikacji są większe niż w przypadku komórek dzikich, jednakże zmiana ta dotyczy tylko fazy S cyklu komórkowego. Oddziaływanie hnRNP UL1 z FUS w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego może więc wiązać się z inną ścieżką molekularną, w której oba białka uczestniczą. Niemniej, aby to potwierdzić, potrzebne są kolejne badania.

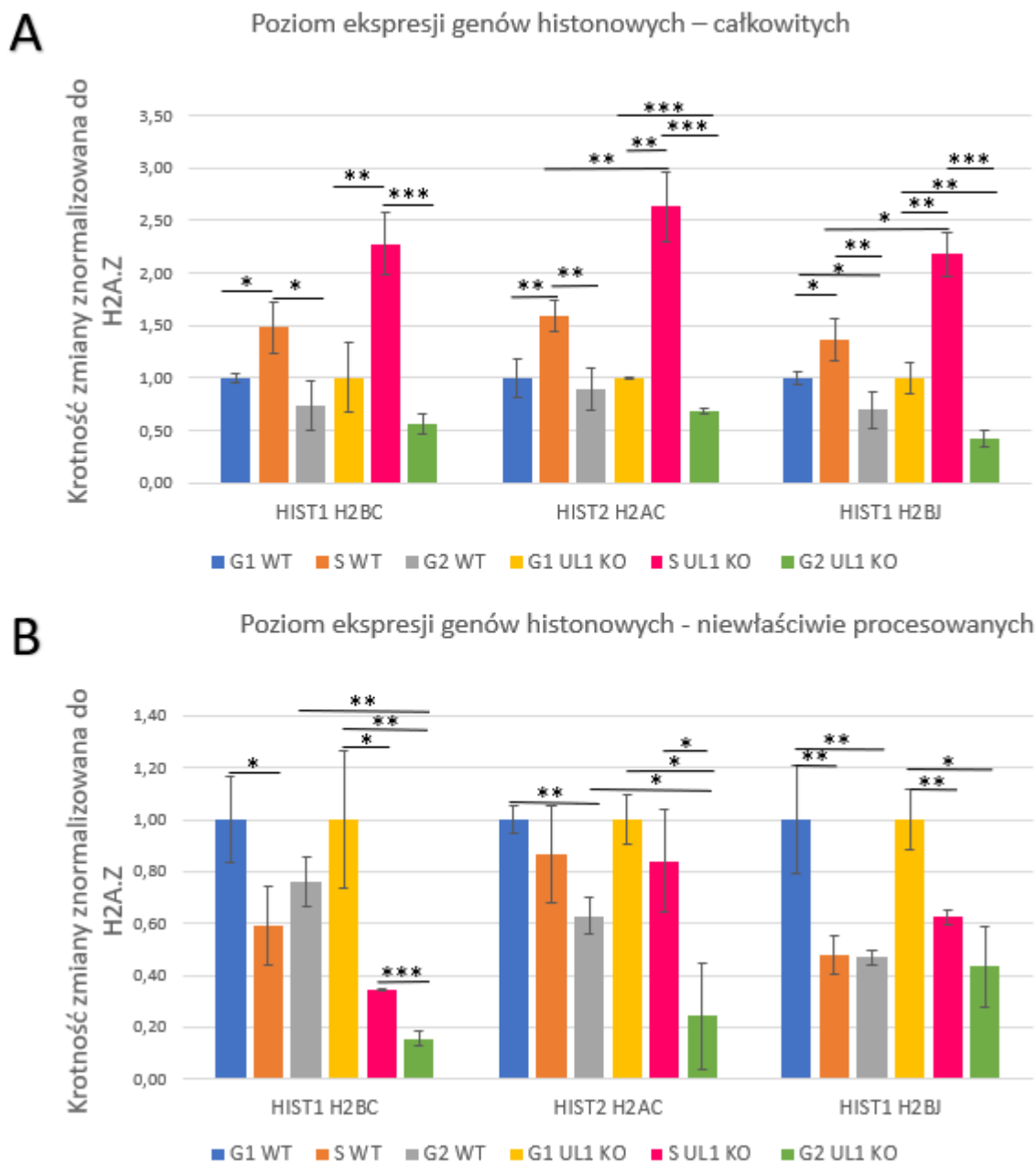


Figura 24. Analiza poziomów ekspresji genów histonowych w komórkach HEK WT i HEK UL1 KO w fazach G1, S i G2 cyklu komórkowego. Porównanie poziomów transkryptów (A) całkowitych do (B) niewłaściwie procesowanych (poliadenylowanych) dla genów *HIST1H2BC*, *HIST2H2AC* i *HIST1H2BJ*. H2A.Z został użyty jako normalizator. Słupki błędów przedstawiają SD z trzech powtórzeń biologicznych. Wartości P obliczono za pomocą testu t-Studenta, a istotność statystyczną przedstawiono w następujący sposób: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

6. Dyskusja

6.1. Funkcje białka hnRNP UL1 w jąderkach komórek ludzkich

Wyniki esperymentów opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazały, że białko hnRNP UL1 jest zlokalizowane w jąderkach komórek ludzkich (Fig. 3). Wyciszenie genu *HNRNPUL1* powoduje zmienioną ekspresję genów rRNA, co sugeruje rolę hnRNP UL1 w syntezie rRNA i ich dojrzewaniu (Fig. 7). Wykazałam, że hnRNP UL1 wpływa na rekrutację RNA Pol I do promotorów genów rRNA i regionów 5.8S, 18S i 47S rDNA, wskazując tym samym na jego funkcję w transkrypcji genów rRNA w jąderku komórkowym (Fig. 8). Ponadto, białko hnRNP UL1 reguluje poziom prekursora 47S rRNA i co za tym idzie jego produktów pośrednich 30S, 26S, 21S i 18S-E rRNA, działając jako aktywator. Zaobserwowaliśmy również, że hnRNP UL1 oddziałuje z białkami rybosomowymi (Fig. 9) oraz może zmieniać ekspresję wybranych genów białek rybosomowych, chociaż nie wpływa ani na poziom białek rybosomowych RPS6 i RPS15 (Fig. 9B) ani na poziom polisomów (Fig. 10). To sugeruje, że białko hnRNP UL1 może być zaangażowane w transport białek rybosomowych, ale nie w biogenezę rybosomów. Brak współzależności między poziomem mRNA a poziomem białek rybosomowych nie jest zaskakujący, biorąc pod uwagę istotną funkcję, jaką białka rybosomowe ogrywiają we wzroście komórek. Wykazano, że regulacja transkrypcyjna nie odgrywa znaczącej roli w mechanizmie dostosowywania biosyntezy rybosomów do specyficznych wymagań komórek, a produkcja białek rybosomowych jest regulowana głównie na poziomie translacyjnym i potranslacyjnym (Caldarola i in., 2009). Dlatego zmniejszony poziom transkryptu może być równoważony zwiększoną translacją lub stabilnością białka.

Inną funkcją, jaką hnRNP UL1 pełni w jąderku komórkowym, jest udział w naprawie uszkodzeń n-DNA, podobnie do funkcji jaką białko to pełni w jądrze komórki. Z publikacji naukowych wiemy, że hnRNP UL1 i hnRNP UL2 wspólnie stymulują resekcję końca DNA i promują sygnalizację zależną od ATR oraz naprawę DSB przez HR, wpływając na żywotność komórek. Zaobserwowałam, że komórki z wyciszeniem hnRNP UL1 wykazywały zwiększoną wrażliwość na uszkodzenia DNA, co skutkowało zwiększoną liczbą martwych komórek. Podobne wyniki uzyskano dla komórek z wyciszeniem Treacle i MRE11, które są kluczowymi białkami zaangażowanymi w n-DDR i szlak naprawy HR w jąderku (Korsholm i in., 2019; Korsholm i in., 2020; Mooser i in., 2020). Ponadto, zbadalam interakcję białka hnRNP UL1 z następującymi białkami: γ H2A.X, 53BP1, RAD50, RPA32, XRCC1 i Chk1, zaangażowanymi w różne ścieżki naprawy uszkodzeń DNA (Fig. 14).

Białko γ H2A.X to histon H2A.X w formie ufosforylowanej, który jest wymagany do zatrzymania cyklu komórkowego i naprawy uszkodzeń DNA po DSB (Griesbach i in., 2021). Wiadomo, że n-DDR w jąderku ma cechy wspólne z DDR w jądrze komórkowym, jest to jednak niezależna odpowiedź na uszkodzenia rDNA. Jedną z podstawowych różnic jest inny skład chromatyny rDNA, gdzie histon H2A.X ma znacznie mniejszą zajętość nukleosomów, więc po aktywacji ATM można zaobserwować zmniejszoną lokalizację fosforylowanej formy H2A.X w jąderku (Harding i in., 2015; Korsholm i in., 2020). I rzeczywiście, w moich badaniach zaobserwowałam nieliczne punkty wskazujące na kolokalizację białka γ H2A.X z białkiem hnRNP UL1 w jąderku, niemniej świadczy to o oddziaływaniu tych dwóch białek ze sobą i udziale w sygnalizacji uszkodzeń rDNA (Fig. 11). Co ciekawe, po indukcji uszkodzeń DNA za pomocą odczynnika CPT, zarówno w komórkach HeLa WT, jak i HeLa FUS KO, obserwowałam kolokalizację hnRNP UL1 z histonem γ H2A.X głównie na obrzeżach jąder komórkowych (Fig. 12). Świadczy to o tym, że po uszkodzeniu DNA białko hnRNP UL1 jest rekrutowane do czapeczek jąderkowych, gdzie pośredniczy w szlaku naprawy na ścieżce HR.

Z kolei, 53BP1 odgrywa kluczową rolę w naprawie DSB poprzez promowanie ścieżki NHEJ i specyficzne przeciwdziałanie funkcji białka BRCA1 biorącego udział w naprawie na ścieżce HR (Callen i in., 2013). Nie zaobserwowałam specyficznych oddziaływań pomiędzy białkami hnRNP UL1 i 53BP1.

W jądrze komórkowym podczas odpowiedzi komórkowej na DSB, hnRNP UL1 wiąże się z NBS1, który jest częścią kompleksu MRN, zaangażowanego w naprawę DSB na ścieżce HR zarówno w jądrze, jak i jąderku komórkowym (de Jager M i in., 2021). Podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej analizowałam oddziaływanie w jąderkach komórkowych hnRNP UL1 z inną podjednostką kompleksu MRN, RAD50. Nie zaobserwowałam jednak specyficznych interakcji pomiędzy hnRNP UL1 a RAD50 ani we frakcji NO, ani CN. Białko hnRNP UL1 działa przez cały okres naprawy DNA, nie tylko przy rekrutacji MRN i CtIP, ale również by promować rekrutację helikazy BLM do miejsc uszkodzeń DNA. Rekrutacja hnRNP UL1 do DSB jest zależna od kompleksu MRN i PARP1, być może więc hnRNP UL1 oddziałuje z NBS1 również w jąderku, co należałoby potwierdzić (Barral i in., 2005; Blackford i in., 2017; Gurunathan i in., 2015; Hong i in., 2013; Polo i in., 2012; Sharma i in., 2015).

RPA32, znany również jako RPA2, jest składnikiem kompleksu RPA, który rozpoznaje ssDNA i jest jednym z głównych kompleksów zaangażowanych w ścieżkę naprawy uszkodzeń DNA zarówno w jądrze, jak i jąderku komórkowym. Kompleks RPA

za pośrednictwem białka regulatorowego ATRIP aktywuje kinazę ATR, która jest głównym regulatorem ścieżki naprawy uszkodzeń dwuniciowego DNA i uczestniczy w rekrutacji czynników naprawy DSB: RAD51 i RAD52. Kinaza ATR rekrutuje również białka takie jak endonukleazy XPA i XPG, które są zaangażowane w naprawę DNA poprzez wycięcie nukleotydu (Sleeth i in., 2007). Moje wyniki wskazują na silne oddziaływanie białka hnRNP UL1 z RPA32, wskazując ponownie na udział białka hnRNP UL1 w ścieżce naprawy HR. Jednak eksperyment immunofluorescencji nie pokazał silnej kolokalizacji tych dwóch białek w jąderku, co może wynikać z ograniczonej ilości obu białek w tym przedziale komórkowym (Fig. 15D).

Z kolei, XRCC1 uczestniczy w naprawie uszkodzeń ssDNA pośrednicząc w tworzeniu kompleksów białek DDR. Moje wyniki wskazują na oddziaływanie białka hnRNP UL1 z białkiem XRCC1 we frakcji NO, sugerując, że białko hnRNP UL1 bierze udział również w naprawie ssDNA. Jest to pierwsze doniesienie na temat roli hnRNP UL1 w naprawie uszkodzeń ssDNA w jąderku komórkowym poprzez interakcję z XRCC1 (Fig. 14B).

Natomiast, serynowo-treoninowa kinaza białkowa Chk1 jest wymagana do zatrzymania cyklu komórkowego i aktywacji naprawy DNA po DSB. Chk1 jest również aktywowana po uszkodzeniach jąderkowego DNA (Mooser i in., 2020). Oddziaływanie białka hnRNP UL1 z kinazą Chk1 wskazuje na udział białka hnRNP UL1 w dalszych etapach naprawy rDNA po DSB, ponieważ kinazy Chk1 i Chk2 mogą przyczyniać się do wyciszenia transkrypcji poniżej ATM i ATR.

Podsumowując, moje wyniki wskazują, że hnRNP UL1 oddziałuje we frakcji jąderkowej przede wszystkim z białkami: γ H2A.X, RPA32, XRCC1 i Chk1 (Fig. 14 i 15), sugerując tym samym jego lokalizację w miejscach uszkodzeń rDNA i udział w różnych ścieżkach naprawczych w jąderku komórkowym.

Ostatnio wykazano, że w rekrutacji czynników DDR do miejsc uszkodzeń DNA uczestniczy białko FUS. Ponadto, aktywacja DDR i formowanie kompleksów naprawczych w jądrze wymaga zjawiska separacji faz ciecz-ciecz, LLPS (ang. liquid-liquid phase separation), zależnego od FUS (Levone i in., 2021). Wykazano również, że FUS zmienia lokalizację po indukcji pęknięć DNA przez topoizomerazę typu I (TOP1), a także lokalizuje się w jąderkach komórkowych w odpowiedzi na inhibicję polimerazy RNA II (Martinez-Macias i in., 2019). Według naszych badań, białko FUS wchodzi w interakcję z białkiem hnRNP UL1 w jądrze komórek ludzkich (Fig. 3C) (Raczyńska i in., 2015). Bazując na danych literaturowych postanowiliśmy sprawdzić, czy również w

jądkerku oba białka ze sobą oddziałują i biorą udział w sygnalizacji i naprawie rDNA po uszkodzeniach wywołanych przez ETO, inhibitor topoizomerazy typu II i CPT, inhibitor topoizomerazy typu I. Wyniki naszych eksperymentów wskazały, że oba białka oddziałują ze sobą również w jąderku komórkowym (Fig. 3), jednak wyciszenie białka FUS nie miało znaczącego wpływu na lokalizację hnRNP UL1 w jąderkach (Fig. 12). Lokalizację białka hnRNP UL1 w jąderku obserwowaliśmy zarówno w linii komórkowej HeLa WT jak i HeLa FUS KO, co więcej, po uszkodzeniach rDNA wywołanych przez CPT, w obu typach komórek białko hnRNP UL1 lokalizowało się silnie na obrzeżach jąderek, sugerując rekrutację tego białka do czapeczek jąderkowych i udział w ścieżce naprawy HR uszkodzonego rDNA.

Podsumowując, wyniki moich badań sugerują dwie funkcje białka hnRNP UL1 w jąderkach komórek ludzkich: jako aktywatora transkrypcji genów rRNA oraz czynnika zaangażowanego w naprawę uszkodzeń jąderkowego DNA, zarówno jednoniciowych jak i dwuniciowych pęknięć DNA, w tym w ścieżkę naprawy HR. Szczegóły tych mechanizmów pozostają jednak wciąż niejasne i wymagają kolejnych badań.

6.2. Rola białka hnRNP UL1 w inhibicji ekspresji genów histonowych

Jedną z funkcji białka hnRNP UL1, oprócz funkcji regulatora transkrypcji i udziału w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA, jest inhibicja zależnej od replikacji ekspresji genów histonowych w kompleksie z U7 snRNP, w warunkach zatrzymania cyklu komórkowego (Ideue i in., 2012). Na początku mojej pracy doktorskiej rozpoczęłam projekt badawczy, którego celem było wykazanie udziału kompleksu U7 snRNP/hnRNP UL1 w inhibicji ekspresji genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego. Kompleks U7 snRNP pełni kluczową rolę w fazie S cyklu komórkowego podczas dojrzewania końca 3' transkryptów histonów rdzeniowych.

Wcześniejsze badania grupy Laboratorium Dojrzewania RNA oraz doniesienia literaturowe (Godfrey i in., 2009; Raczyńska i in., 2015) wykazały, że zarówno białka kompleksu U7 snRNP jak i U7 snRNA, ulegają stabilnej ekspresji podczas trwania całego cyklu komórkowego, co może świadczyć o roli tego kompleksu również poza fazą S cyklu. Zakładaliśmy więc, że U7 snRNP może przełączać swoje funkcje z aktywatora na represora i wraz z białkiem hnRNP UL1 w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego pełnić rolę inhibitora ekspresji genów histonowych.

Wiadomo również, że białko FUS wiąże hnRNP UL1 w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego (Raczynska et al., 2015). Postawiliśmy zatem hipotezę badawczą, która

zakładała, że U7 snRNP wraz z białkami hnRNP UL1 i FUS działa jako represor ekspresji genów histonowych poza fazą S cyklu komórkowego. Co ciekawe, obniżony poziom białka FUS w liniach HEK UL1 KO sugeruje, że białko hnRNP UL1 może być aktywatorem ekspresji/poziomu białka FUS. Natomiast, poziom białka hnRNP UL1 w liniach HeLa FUS KO jest podwyższony, co sugeruje, że białko FUS może być negatywnym regulatorem ekspresji/poziomu białka hnRNP UL1 (Fig. 18). Z kolei, poziom transkryptu U7 snRNA w liniach HEK UL1 KO nie zmienił się statystycznie istotnie, co wskazuje, że białko hnRNP UL1 nie ma wpływu na poziom U7 snRNA.

W pierwszej części moich badań potwierdziłam, że zgodnie z naszą hipotezą badawczą, białka FUS i hnRNP UL1 oddziałują ze sobą najsilniej poza fazą S cyklu komórkowego, głównie w fazie G1 cyklu komórkowego. Analizę wzajemnych interakcji przeprowadziliśmy techniką PLA w komórkach HeLa synchronizowanych do fazy G1, S i G2 (Fig. 19). Następnie, w eksperymencie IP wykazałam, że to C-końcowa domena białka FUS jest niezbędna do oddziaływania z hnRNP UL1 (Fig. 20).

W kolejnym etapie chciałam określić, jak przeciwstawne funkcje hnRNP UL1 są przełączane zależnie od fazy cyklu komórkowego. Dlatego sprawdziłam poziom potranslacyjnej modyfikacji białka hnRNP UL1, fosforylacji, w różnych fazach - zmiennie modyfikowane aminokwasy to potencjalne miejsca odpowiedzialne za zróżnicowane oddziaływania. W tym celu użyłam odczynnik Phos-taq, który umożliwił rozdzielenie w żelu białkowym form białka w pełni fosforylowanych od defosforylowanych (Fig. 21). Wykazałam, że poziom formy fosforylowanej/defosforylowanej białka hnRNP UL1 zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego, i że prawdopodobnie hnRNP UL1 w formie fosforylowanej oddziałuje z FUS. Z kolei, w eksperymencie IP po przejściowej transfekcji plazmidem kodującym białko hnRNP UL1 z mutacjami w sekwencji RGG/RG wykazałam, że metylacje argininy nie mają wpływu na oddziaływanie z FUS (Fig. 22).

W następnym etapie podjęłam próbę określenia czy FUS i hnRNP UL1 regulują wzajemne oddziaływania z U7 snRNP. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zaplanowałam eksperyment immunoprecypitacji RNA (RIP) w komórkach HeLa FUS KO oraz HEK UL1 KO. Wynik eksperymentu pokazał, że zarówno FUS jak i hnRNP UL1 silniej wiążą U7 snRNA przy braku drugiego białka, sugerując, że oba białka konkurują o dostępność do U7 snRNA (Fig. 23).

Ponadto, sprawdziłam wpływ wyciszenia białka hnRNP UL1 na ekspresję genów histonowych w różnych fazach cyklu komórkowego. Zgodnie z oczekiwaniami, w

komórkach typu dzikiego ekspresja genów histonów zależnych od replikacji wzrasta w fazie S cyklu komórkowego (Fig. 24A). W fazie tej, w porównaniu z fazami G1 i G2, zaobserwowałam zarówno podwyższony poziom całkowitych transkryptów (zwiększona transkrypcja) jak i obniżony poziom niewłaściwie procesowanych (poliadenylowanych) transkryptów (wyższa wydajność dojrzewania końca 3'). Jednak po wyciszeniu hnRNP UL1 (komórki UL1 KO), różnice w transkrypcji i wydajności dojrzewania końca 3' w fazie S cyklu komórkowego są większe. Może to wskazywać, że białko hnRNP UL1 odgrywa rolę represora ekspresji genów histonowych zależnych od replikacji tylko w fazie S cyklu komórkowego. Natomiast w fazach G1 i G2 cyklu komórkowego, białko hnRNP UL1 nie wpływa na inhibicję ekspresji tych genów.

7. Podsumowanie

- Białko hnRNP UL1 zostało zlokalizowane w jąderkach komórek ludzkich;
- białko hnRNP UL1 stymuluje transkrypcję genów rRNA;
- komórki HEK UL1 KO są bardziej wrażliwe na uszkodzenia DNA;
- białko hnRNP UL1 oddziałuje z białkami lokalizacji i naprawy uszkodzeń DNA: γ H2A.X, RPA32, XRCC1 i Chk1 w jąderkach komórek ludzkich, co sugeruje jego udział w naprawie uszkodzeń rDNA;
- białka FUS i hnRNP UL1 oddziałują ze sobą najsilniej poza fazą S cyklu komórkowego;
- po wyciszeniu hnRNP UL1 poziom białka FUS maleje, natomiast poziom U7 snRNA pozostaje bez zmian. Z kolei, poziom hnRNP UL1 wzrasta po wyciszeniu białka FUS.
- zarówno FUS jak i hnRNP UL1 silniej wiążą U7 snRNA przy braku drugiego białka, wskazując, że oba białka mogą konkurować o dostępność do U7 snRNA;
- poziom form fosforylowanej/defosforylowanej białka hnRNP UL1 zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego i może mieć wpływ na zmienne oddziaływanie z białkiem FUS, takiego wpływu nie mają metylacje argininy w białku hnRNP UL1;
- białko hnRNP UL1 nie hamuje ekspresji genów histonowych w fazie G1 czy G2 cyklu komórkowego, wydaje się jednak być inhibitorem ekspresji tych genów w fazie S.

8. Literatura

Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, et al. Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. 2005; 433: 77-83.

Barral PM, Rusch A, Turnell AS, Gallimore PH, Byrd PJ, Dobner T, et al. The interaction of the hnRNP family member E1B-AP5 with p53. *Febs Lett*. 2005; 579: 2752-8.

Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017; 66: 801-17.

Blackwell DL, Fraser SD, Caluseriu O, Vivori C, Tyndall AV, Lamont RE, et al. Hnrnpull controls transcription, splicing, and modulates skeletal and limb development in vivo. *G3-Genes Genom Genet*. 2022.

Caldarola S, De Stefano MC, Amaldi F, Loreni F. Synthesis and function of ribosomal proteins--fading models and new perspectives. *The FEBS journal*. 2009; 276: 3199-210.

Callen E, Di Virgilio M, Kruhlak MJ, Nieto-Soler M, Wong N, Chen HT, et al. 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell*. 2013; 153: 1266-80.

Cerqueira AV, Lemos B. Ribosomal DNA and the Nucleolus as Keystones of Nuclear Architecture, Organization, and Function. *Trends in genetics : TIG*. 2019; 35: 710-23.

Chen DY, Huang S. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol*. 2001; 153: 169-76.

Ciesiolka A, Stroynowska-Czerwinska A, Joachimiak P, Ciolak A, Kozłowska E, Michalak M, et al. Artificial miRNAs targeting CAG repeat expansion in ORFs cause rapid deadenylation and translation inhibition of mutant transcripts. *Cell Mol Life Sci*. 2021; 78: 1577-96.

Correll CC, Bartek J, Dunder M. The Nucleolus: A Multiphase Condensate Balancing Ribosome Synthesis and Translational Capacity in Health, Aging and Ribosomopathies. *Cells*. 2019; 8.

Coute Y, Burgess JA, Diaz JJ, Chichester C, Lisacek F, Greco A, et al. Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass spectrometry reviews*. 2006; 25: 215-34.

de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell*. 2001; 8: 1129-35.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013; 29: 15-21.

Emmott E, Hiscox JA. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO reports*. 2009; 10: 231-8.

Farley KI, Surovtseva Y, Merkel J, Baserga SJ. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma*. 2015; 124: 323-31.

Farley-Barnes KI, Ogawa LM, Baserga SJ. Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. *Trends in genetics : TIG*. 2019; 35: 754-67.

Floutsakou I, Agrawal S, Nguyen TT, Seoighe C, Ganley AR, McStay B. The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome research*. 2013; 23: 2003-12.

Gabler S, Schutt H, Groitl P, Wolf H, Shenk T, Dobner T. E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *Journal of virology*. 1998; 72: 7960-71.

Gadgil A, Walczak A, Stepien A, Mechttersheimer J, Nishimura AL, Shaw CE, et al. ALS-linked FUS mutants affect the localization of U7 snRNP and replication-dependent histone gene expression in human cells. *Scientific reports*. 2021; 11: 11868.

Griesbach E, Schlackow M, Marzluff WF, Proudfoot NJ. Dual RNA 3'-end processing of H2A.X messenger RNA maintains DNA damage repair throughout the cell cycle. *Nature communications*. 2021; 12: 359.

Grummt I. The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma*. 2013; 122: 487-97.

Gurunathan G, Yu Z, Coulombe Y, Masson JY, Richard S. Arginine methylation of hnRNPUL1 regulates interaction with NBS1 and recruitment to sites of DNA damage. *Scientific reports*. 2015; 5: 10475.

Harding SM, Boiarsky JA, Greenberg RA. ATM Dependent Silencing Links Nucleolar Chromatin Reorganization to DNA Damage Recognition. *Cell reports*. 2015; 13: 251-9.

Hinsby AM, Kiemer L, Karlberg EO, Lage K, Fausboll A, Juncker AS, et al. A wiring of the human nucleolus. *Mol Cell*. 2006; 22: 285-95.

Hoch NC, Hanzlikova H, Rulten SL, Tetreault M, Komulainen E, Ju L, et al. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia. *Nature*. 2017; 541: 87-91.

Hong Z, Jiang J, Ma J, Dai S, Xu T, Li H, et al. The role of hnRNPUL1 involved in DNA damage response is related to PARP1. *PloS one*. 2013; 8: e60208.

Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol*. 2002; 157: 739-41.

Hustedt N, Durocher D. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature cell biology*. 2016; 19: 1-9.

Ideue T, Adachi S, Naganuma T, Tanigawa A, Natsume T, Hirose T. U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109: 5693-8.

Korsholm LM, Gal Z, Lin L, Quevedo O, Ahmad DA, Dulina E, et al. Double-strand breaks in ribosomal RNA genes activate a distinct signaling and chromatin response to facilitate nucleolar restructuring and repair. *Nucleic acids research*. 2019; 47: 8019-35.

Korsholm LM, Gal Z, Nieto B, Quevedo O, Boukoura S, Lund CC, et al. Recent advances in the nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*. 2020; 48: 9449-61.

Kruhlak M, Crouch EE, Orlov M, Montano C, Gorski SA, Nussenzweig A, et al. The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature*. 2007; 447: 730-4.

Langhendries JL, Nicolas E, Doumont G, Goldman S, Lafontaine DL. The human box C/D snoRNAs U3 and U8 are required for pre-rRNA processing and tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016; 7: 59519-34.

Larsen DH, Hari F, Clapperton JA, Gwerder M, Gutsche K, Altmeyer M, et al. The NBS1-Treacle complex controls ribosomal RNA transcription in response to DNA damage. *Nature cell biology*. 2014; 16: 792-803.

Levone BR, Lenzen SC, Antonaci M, Maiser A, Rapp A, Conte F, et al. FUS-dependent liquid-liquid phase separation is important for DNA repair initiation. *J Cell Biol*. 2021; 220.

Li ZF, Lam YW. A New Rapid Method for Isolating Nucleoli. *Methods Mol Biol*. 2015; 1228: 35-42.

Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014; 30: 923-30.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15.

Mangan H, Gailin MO, McStay B. Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli. *Febs Journal*. 2017; 284: 3977-85.

Marnef A, Finoux AL, Arnould C, Guillou E, Daburon V, Rocher V, et al. A cohesin/HUSH- and LINC-dependent pathway controls ribosomal DNA double-strand break repair. *Genes & development*. 2019; 33: 1175-90.

Martin M. Web 2.0-based e-learning. *Brit J Educ Technol*. 2011; 42: E172-E3.

Martinez-Macias MI, Moore DAQ, Green RL, Gomez-Herreros F, Naumann M, Hermann A, et al. FUS (fused in sarcoma) is a component of the cellular response to topoisomerase I-induced DNA breakage and transcriptional stress. *Life Sci Alliance*. 2019; 2.

Matos-Perdomo E, Machin F. Nucleolar and Ribosomal DNA Structure under Stress: Yeast Lessons for Aging and Cancer. *Cells*. 2019; 8.

Mooser C, Symeonidou IE, Leimbacher PA, Ribeiro A, Shorrocks AMK, Jungmichel S, et al. Treacle controls the nucleolar response to rDNA breaks via TOPBP1 recruitment and ATR activation. *Nature communications*. 2020; 11.

Nemeth A, Grummt I. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr Opin Cell Biol*. 2018; 52: 105-11.

Pendle AF, Clark GP, Boon R, Lewandowska D, Lam YW, Andersen J, et al. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Molecular biology of the cell*. 2005; 16: 260-9.

Perez-Riverol Y, Bai JW, Bandla C, Garcia-Seisdedos D, Hewapathirana S, Kamatchinathan S, et al. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic acids research*. 2022; 50: D543-D52.

Phair RD, Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 2000; 404: 604-+.

Polo SE, Blackford AN, Chapman JR, Baskcomb L, Gravel S, Rusch A, et al. Regulation of DNA-End Resection by hnRNPU-like Proteins Promotes DNA Double-Strand Break Signaling and Repair. *Mol Cell*. 2012; 45: 505-16.

Raczynska KD, Ruepp MD, Brzek A, Reber S, Romeo V, Rindlisbacher B, et al. FUS/TLS contributes to replication-dependent histone gene expression by interaction with U7 snRNPs and histone-specific transcription factors. *Nucleic acids research*. 2015; 43: 9711-28.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013; 8: 2281-308.

Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. New insights into nucleolar architecture and activity. *International review of cytology*. 2006; 255: 177-235.

Schofer C, Weipoltshammer K. Nucleolus and chromatin. *Histochem Cell Biol*. 2018; 150: 209-25.

Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2019; 20: 698-714.

Sharma V, Khurana S, Kubben N, Abdelmohsen K, Oberdoerffer P, Gorospe M, et al. A BRCA1-interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO reports*. 2015; 16: 1520-34.

Siebenwirth C, Greubel C, Drexler GA, Reindl J, Walsh DWM, Schwarz B, et al. Local inhibition of rRNA transcription without nucleolar segregation after targeted ion irradiation of the nucleolus. *J Cell Sci*. 2019; 132.

Sleeth KM, Sorensen CS, Issaeva N, Dziegielewska J, Bartek J, Helleday T. RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. *Journal of molecular biology*. 2007; 373: 38-47.

Stochaj U, Weber SC. Nucleolar Organization and Functions in Health and Disease. *Cells*. 2020; 9.

Szaflarski W, Lesniczak-Staszak M, Sowinski M, Ojha S, Aulas A, Dave D, et al. Early rRNA processing is a stress-dependent regulatory event whose inhibition maintains nucleolar integrity. *Nucleic acids research*. 2022; 50: 1033-51.

Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G. The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *Int J Mol Sci*. 2017; 18.

Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*. 2017; 168.

van Sluis M, McStay B. A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes & development*. 2015; 29: 1151-63.

Velichko AK, Razin SV, Kantidze L. DNA Damage Response in Nucleoli. *Mol Biol+*. 2021; 55: 182-92.

Villacis LN, Wong MS, Ferguson LL, Hein N, George AJ, Hannan KM. New Roles for the Nucleolus in Health and Disease. *Bioessays*. 2018; 40.

Vitor AC, Huertas P, Legube G, de Almeida SF. Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. *Front Mol Biosci*. 2020; 7.

Warmerdam DO, van den Berg J, Medema RH. Breaks in the 45S rDNA Lead to Recombination-Mediated Loss of Repeats. *Cell reports*. 2016; 14: 2519-27.

Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences*. 1999; 24: 437-40.

Wickham H, Spathis A, Chin C, Ryan R, Booth S. Practical management of chronic breathlessness. *Bmj*. 2016; 354: h6200.