

Received: 2015.05.28
Accepted: 2016.05.27
Published: 2016.09.28

Klasyfikacja, budowa i funkcjonowanie białek Ago u Eukariontów*

The classification, structure and functioning of Ago proteins in Eukaryotes

Aleksandra Poterala^{1,2}, Joanna Rzeszowska-Wolny^{1,2}

¹Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej

²Grupa Biosystemów, Instytut Automatyki, Zakład Inżynierii Systemów, Politechnika Śląska, Gliwice

Streszczenie

Białka Ago są przedstawicielami wyspecjalizowanej i konserwatywnej rodziny Argonaute, odpowiedzialnej przede wszystkim za regulację ekspresji genów przez mechanizm interferencji RNA. Ago wchodzące w skład kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex) odpowiadają za wiązanie krótkiego RNA i trawienie lub hamowanie translacji docelowego mRNA. Przełącznikiem między tymi funkcjami jest prawdopodobnie fosforylacja, chociaż nie wyklucza się również roli stężenia jonów magnezu. Najnowsze doniesienia wskazują, że w pewnych sytuacjach Ago mogą się łączyć z mRNA i spowodować zahamowanie translacji również bez udziału krótkiego RNA. Białka te biorą także udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA za pośrednictwem rekombinacji homologicznej, w modyfikacjach chromatyny i alternatywnym splicingu, analizowany jest też ich wpływ na cykl komórkowy i senescencję. Ekspresja białek Ago jest tkankowo swoista, co potencjalnie może być wykorzystane w celach diagnostycznych. Poznanie struktury mechanizmów funkcjonowania Ago jest więc podstawowe dla zrozumienia wielu procesów komórkowych. W artykule skoncentrowano się na budowie białek Ago z uwzględnieniem modyfikacji potranslacyjnych, przedstawiono dane i hipotezy dotyczące oddziaływań z krótkimi RNA i mRNA w tym mechanizmów sortowania siRNA/miRNA do poszczególnych przedstawicieli podrodziny Ago oraz ich rolę w komórkach eukariotycznych. Opisano również najnowszą, opartą na badaniach ewolucyjnych klasyfikację Ago w obrębie rodziny Argonaute oraz interakcje z DNA.

Słowa kluczowe:

Argonaute • Ago • siRNA • miRNA • interferencja RNA

Summary

Ago proteins are members of the highly specialized and conserved Argonaute family, primarily responsible for regulation of gene expression. As a part of RNA-induced silencing complexes (RISCs) Ago proteins are responsible for binding a short RNA and cleavage/inhibition of translation of target mRNAs. Phosphorylation may work as the switch between those two functions, but the role of magnesium ion concentration is also taken into consideration. Recent reports indicate that Ago proteins can interact with an mRNA and cause inhibition of translation without the participation of a short RNA.

As key elements in RNA interference processes, Ago proteins are an important and intensively exploited area of research. Furthermore, these proteins are involved in the repair of DNA

* Praca była finansowana ze środków Politechniki Śląskiej BKM-514/RAU1/2015.
NCN, numer grantu DEC-2012/04/A/ST7/00353.

double-strand breaks by homologous recombination, modifications of chromatin, and alternative splicing. Their role in the cell cycle and senescence is also being studied. In addition, Ago expression is tissue-specific, which potentially may be used for diagnostic purposes. Understanding the mechanisms of Ago functioning is therefore crucial for understanding many cellular processes. The following article presents a detailed description of the Ago proteins including their post-translational modifications, recent data and hypotheses concerning their interactions with short RNAs and mRNAs as well as the mechanisms of siRNA/miRNA sorting into individual members of the Ago subfamily, and their role in eukaryotic cells. The latest classification of Ago proteins within the Argonaute family based on evolutionary studies and their possible interactions with DNA are also described.

Keywords: Argonaute • Ago • siRNA • miRNA • RNA interference

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1220383>

Word count: 7014

Tables: –

Figures: 3

References: 109

Adres autorki: prof. dr hab. Joanna Rzeszowska, Zakład Inżynierii Systemów, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice; e-mail: Joanna.Rzeszowska@polsl.pl

Wykaz skrótów: **3BP1** – białko wiążące p53 (p-53 binding protein), **B-Cdk1** – cyklina B1 oddziałująca z kinazą cyklinozależną (cyclin B1 interacting with cyclin-dependent kinase), **CCR4-NOT complex** – Carbon catabolite - repressor protein 4-Not complex, **Cdc25** – cell division cycle 25 phosphatase, **CIR-147** – chromosome internal repeats, **CSR-1** – Chromosome Segregation and RNAi Deficient protein, **dsRNA** - dwuniciowy RNA (double strand RNA), **FKBP5** - FK506 binding protein 5, **grp** – białko uwalniające gastrynę (gastrin- releasing peptide), **GW182** – glycine-tryptophan protein of 182kDa, **Mdc1** – Mediator of DNA damage checkpoint protein 1, **mei-41** – Serine/threonine protein kinase ATR, **NDP52** – nuclear dot protein 52kDa, **PAN2-PAN3** – Poly(A)nuclease 2 poly(A) nuclease 3 complex, **PAZ** – Piwi-Argonaute-Zwille, **piRNA** – piwi-interacting RNA, **PIWI** – P element-induced wimpy testis, **Rad51** – DNA repair protein RAD51 homolog 1, **RPA** – czynnik replikacyjny A (Replication protein), **snoRNA** – małe jąderkowe RNA (small nucleolar RNA), **SUMO** – Small Ubiquitin-like Modifier proteins, **SWI/SNF** – Switch/sucrose non fermentable, **TB-RBP** – Testis/brain-RNA-binding protein, **TDRD** – Tudor domain-containing proteins, **TNRC6A** – Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein, **TRAX** – Translin-associated Factor X, **TRBP** – HIV-1 TAR RNA binding protein, **TRIM71** - tripartite motif containing 71, E3 ubiquitin protein ligase, **wee1** – Mitosis inhibitor protein kinase ATR.

WSTĘP

Interferencja RNA (RNAi) to postać potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, a jej odkrycie otworzyło wiele możliwości w nauce i medycynie. Mechanizm zjawiska polega na indukowaniu degradacji mRNA lub blokowaniu jego translacji przez krótkie, skompleksowane z białkami, niekodujące cząsteczki RNA. W mechanizmie interferencji głównym elementem, oprócz krótkiego RNA, jest wielobiałkowy kompleks RISC (RNA-induced silencing complex) odpowiadający za wiele etapów od dojrzewania krótkiego RNA powstającego z dwuniciowych prekursorów, po oddziaływanie z docelowym mRNA i blokowanie jego funkcji. Przebieg interferencji zależy w dużym stopniu od budowy RISC, a zwłaszcza od białka Argonaute, które jest głównym składnikiem kompleksu niezbędnym do zającia procesu.

Poznanie struktury i funkcji białek Argonaute to jedno z głównych wyzwań od czasu odkrycia zjawiska interferencji RNA. Białka Argonaute występują u bakterii, archebakterii i eukariontów. Pierwsze analizy ich struktury dotyczyły głównie organizmów prokariotycznych oraz drożdży i dostarczyły wstępnych informacji o strukturze, aktywności katalitycznej oraz mechanizmie wiązania krótkich RNA [59]. Najnowsze badania przedstawiciele Argonaute u wyższych eukariota dostarczyły nowych danych dotyczących ewolucji tej grupy białek. Obecnie w rodzinie białek Argonaute wyróżnia się cztery główne podrodziny: Ago, PIWI, WAGO i Trypanosoma Ago. W komórkach ludzkich występują cztery białka z podrodziny Ago (Ago1, Ago2, Ago3 i Ago4) i cztery białka z podrodziny PIWI (HIWI1, HIWI2, HIWI3 i HILI) przy czym Ago1-4 są głównymi wykonawcami mechanizmu interferencji RNA w odniesieniu do większości



mRNA i większości typów komórek, podczas gdy białka podrodziny PIWI uczestniczą przede wszystkim w wygaszaniu RNA transpozonów w procesie spermatogenezy [51].

Wiązanie krótkiego RNA przez białka Argonaute oraz mechanizmy oddziaływania kompleksu RISC z docelowym mRNA to zagadnienia, których wyjaśnienie jest podstawowe dla zrozumienia mechanizmu regulacji ekspresji genów w wyniku interferencji RNA.

RODZINA BIAŁEK ARGONAUTE – AKTUALNY PODZIAŁ OPARTY NA RÓŻNICACH W FUNKCJONOWANIU I BADANIACH EWOLUCYJNYCH

Pierwotne białka Argonaute u prokaryota miały aktywność nukleolityczną, którą wielu znanych dzisiaj przedstawicieli tej rodziny utraciło w toku ewolucji w wyniku niezależnych procesów [84]. Topologia drzewa filogenetycznego prokariotycznych Argonaute sugeruje intensywny horyzontalny transfer kodujących je genów, podobny do schematu ewolucji większości genów związanych z obroną u prokariotów, co pokrywa się z wynikami badań nad rolą Argonaute w obronie gospodarza [84]. U *T.thermophilus* i *E.coli* wykazano, że białka Argonaute obniżają wydajność transformacji i liczbę cząstek plazmidu w komórkach [65,82].

W eukariotycznej rodzinie Argonaute wyróżniano początkowo dwie podrodziny: Ago oraz PIWI. Podział oparty jest na homologii sekwencji odpowiednio względem Ago1 *Arabidopsis thaliana* i PIWI *Drosophila melanogaster* [66]. W późniejszych pracach zaproponowano wyodrębnienie, ze względu na różnice w budowie i funkcjach, podrodziny WAGO występującej u *C.elegans* i Ago zidentyfikowanej u świdrowca *Trypanosoma brucei* [6,24]. Podział uzasadniają dane z drzewa filogenetycznego białek Argonaute przedstawionego przez Swartsa i wsp. [szczegółowo w: 84].

Wykryta u *T. brucei* podrodzina białek TbAgo, podobnie jak prokariotyczne białka Argonaute, jest powiązana z regulacją aktywności transpozonów [84]. Klasyfikację opisanych białek jako osobnej podrodziny zaproponowano w oparciu o badania ewolucyjne oraz różnice w budowie. Chociaż białka Argonaute charakteryzują się bardzo konserwatywną budową u wszystkich badanych organizmów, u *T. brucei* wykryto duże zmiany w obrębie domeny PAZ, w tym przypadki braku tej domeny, z jednoczesnym zachowaniem domeny PIWI i analogicznym fałdowaniem, jak u białek występujących u wyższych eukariotów [24,104]. Prekursorem krótkiego RNA związanego przez TbAgo1 jest długi dwuniciowy RNA powstający z retrotranspozonów [13] lub powtórzeń tandemowych CIR147 (147 bp chromosome internal repeats) umiejscowionych w nietelomerowych regionach chromosomów 4, 5 i 8 [89]. Dojrzewanie transkryptu odbywa się z udziałem enzymów TbDcl1 lub TbDcl2 (*T. brucei* Dicer-like enzyme) różniącego się od występującego u wyższych eukariotów białka Dicer organizacją domen. W TbDcl domeny o aktywności RNAzowej znaj-

dują się blisko końca aminowego (RNAzaIIIa) i w centrum cząsteczki (RNAzaIIIb), a nie przy końcu karboksylowym jak w przypadku białka Dicer [77].

WAGO (Worm specific Argonaute) to podrodzina białek Argonaute swoista dla nicieni (Nematoda). Wiąże się z RNA w odpowiedzi na aktywność innego białka Ago [27,84]. Białka WAGO uczestniczą w regulacji ekspresji genów przez destabilizację docelowego mRNA lub podczas fazy elongacji, a więc równoległe do procesu transkrypcji [27]. Przypuszczalnie WAGO mogą działać hamująco na inne białka z tej samej podrodziny, zapobiegając wyciszeniu niektórych genów. Przykładem może być białko Argonaute CSR-1 z podrodziny WAGO, które przez interakcję z RNA antysensownymi względem genów zarodkowych zapobiega ich wyciszeniu przez kompleksy innych WAGO-piRNA [96].

Funkcja enzymatycznego cięcia mRNA jest najbardziej rozpowszechniona w podrodzinie PIWI. Najczęściej opisywaną rolą białek PIWI jest kontrola aktywności transpozonów w komórkach rozrodczych i liniach zarodkowych zwierząt [17,54]. Wykazano, że u myszy wszystkie białka PIWI są istotne dla prawidłowej spermatogenezy, natomiast u *Drosophila* mutacje w obrębie genów kodujących opisywane białka zaburzają oogenezę i zmniejszają liczbę komórek rozrodczych [3]. U prymitywnych zwierząt jakimi są płazińce zaobserwowano ekspresję białek PIWI w totipotencjalnych komórkach neoblastów zdolnych do różnicowania w dowolne komórki somatyczne lub rozrodcze [59]. PIWI ulegają metylacji katalizowanej m.in. przez metylotransferazę argininową PRMT5, w wyniku czego możliwa jest ich interakcja z białkami zawierającymi domenę Tudor (tzw. białka TDRD), które przypuszczalnie odgrywają rolę w biogenezie piRNA i różnicowaniu komórek zarodkowych [33,41,70]. Niektóre białka z podrodziny PIWI wykazują silną preferencję względem RNA zawierającego uracyl na końcu 5' [84], co jest również cechą roślinnych Ago [56]. Po związaniu takiego RNA jego koniec 3' jest cięty przez egzonukleazę po czym ulega 2'-O-metylacji [51,56]. Mechanizm pełni prawdopodobnie funkcję ochronną, ponieważ podczas wiązania kompleksu PIWI-piRNA z docelowym mRNA dochodzi często do uwolnienia końca 3' piRNA z domeny PAZ, co naraża cząsteczkę na niekontrolowaną addycję urydyny lub adenozyiny i trawienie [1,51,56].

Czwartą podgrupą białek Argonaute są Ago, ich funkcjonowaniu poświęcono dalszą część artykułu.

BIAŁKA AGO

Białka z podrodziny Ago należą do najpowszechniej występujących Argonaute i są zaangażowane w interferencję RNA u większości znanych organizmów [14,30]. Liczba przedstawicieli podrodziny Ago różni się w zależności od organizmu: *Drosophila melanogaster* ma 5 białek Ago, podczas gdy u *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 10 [30,64]. Ludzkie białka Ago obejmują czterech przed-

stawicieli. Gen kodujący białko Ago2 znajduje się na chromosomie 8, natomiast geny kodujące białka Ago1, Ago3 i Ago4 są umiejscowione na chromosomie 1. Nie wiadomo czy skupienie genów na chromosomie 1 wiąże się z podobieństwem funkcji [30]. Ekspresja Ago u ssaków jest swoista tkankowo (różne profile ekspresji w różnych organach), co potencjalnie może być wykorzystane w celach diagnostycznych [90]. Według Smibert i wsp. ekspresja Ago jest regulowana przez poziom dojrzałego miRNA na zasadzie homeostazy [79].

Do krótkich RNA wiązanych przez Ago zalicza się głównie siRNA i miRNA. Częsteczki siRNA powstają z długich, dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) pochodzenia egzo- lub endogennego [25]. Mogą działać zarówno w układzie *cis* jak i *trans*, czyli kierując się do RNA z których pochodzą (*cis*) lub do docelowego mRNA (*trans*) [9,25]. MikroRNA (miRNA) to cząsteczki regulatorowe pochodzenia endogennego działające najczęściej w układzie *trans* [48,98]. Istnieją dowody na wiązanie ludzkiego Ago 2 z nowo powstającymi tRNA i 5S rRNA oraz *loci*, z których te RNA powstają. Proces jest niezależny od siRNA oraz białka Dicer i może być ważnym mechanizmem regulacji w komórkach ludzkich [101]. Krótkie RNA powstające ze snoRNA również mogą być wiązane przez Ago i pełnić funkcję identyczną jak miRNA [87].

DOMENY STRUKTURALNE W BIAŁKACH AGO I ICH FUNKCJE

Pierwsze informacje o strukturze białek Argonaute, w tym Ago, pochodziły z analiz krystalograficznych białek organizmów prokariotycznych: *Pyrococcus furiosus*, *Aquifex aeolicus*, *Archaeoglobus fulgidus* i *Thermus thermophilus* [80,84,93,105]. Z białek eukariotycznych udało się jak dotąd przeprowadzić krystalizację Ago z drożdży *Kluyveromyces polyspora* oraz ludzkich Ago1 i Ago2, związanych z pojedynczą nicią krótkiego RNA [16,18,59,76].

Badania białek prokariotycznych wykazały, że w budowie przedstawicieli rodziny Argonaute można wyróżnić dwa obszary zbudowane łącznie z czterech domen [53,57]. Pierwszy obszar obejmuje domeny N oraz PAZ, natomiast drugi domeny PIWI i MID [54,76]. Funkcje łączników spełniają region L1 łączący domeny N i PAZ oraz region L2 stanowiący łącznik między domeną PAZ i MID [30,105]. Dalsze prace wykazały, że funkcje wszystkich czterech domen są wysoce konserwatywne zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych [84].

Struktura domeny MID ludzkiego Ago2 wykazuje fałdowanie typu Rossmanna (drugorzędowa struktura łańcuch β -helisa α -łańcuch β) [20]. Domena MID wiąże koniec 5' siRNA lub miRNA dzięki obecności kieszeni wiążącej nukleotydy, zawierającej aminokwasy wchodzące w interakcję (stabilizowaną przez jon dwuwartościowy magnezu) z resztą fosforanową występującą na końcu 5' siRNA/miRNA i wiązaniu reszty cukrowej terminalnego nukleotydu na tym końcu

[36,37,84]. Ponadto, w niektórych Ago (np. ludzkim Ago2) występują pętle (nucleotide specificity loop) swoiście rozpoznające zasady azotowe w nukleotydach znajdujących się na końcu 5' krótkiego RNA [19,20]. Mutacje w obrębie aminokwasów tworzących kieszeń w ludzkim Ago2 powodują obniżenie aktywności katalitycznej tego białka polegającej na cięciu nukleolitycznym docelowego mRNA [49,108]. Dodatkową funkcją domeny MID jest utrzymywanie właściwej, ułatwiającej wiązanie z docelowym mRNA, konformacji tzw. rejonu „seed” w miRNA [42].

Wiedza o roli domeny N oparta jest głównie o wyniki badań Hauptmann i wsp. wykazujące, że ludzkie białko Ago3, które nie ma zdolności do cięcia katalitycznego, może uzyskać ją w wyniku zamiany jego domeny N na odpowiednik pochodzący z Ago2 [28]. Podobne rezultaty uzyskano dla Ago1, nie wiadomo jednak w jaki sposób domena N umożliwia aktywność nukleolityczną [18]. Domena N odgrywa również rolę w rozplataniu dupleksu RNA i selekcji nici o mniej stabilnym końcu 5' [44,94].

Badania krystalograficzne i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego domen PAZ u różnych organizmów wykazały obecność kieszeni kotwicznej charakterystyczny dwunukleotydowy wystający koniec 3' krótkiego RNA powstający w wyniku trawienia przez RNAzę III [49,52]. Wiązanie końca 3' chroni krótki RNA przed degradacją, a jego brak lub zmiana wpływa na wiązanie regulowanego mRNA i wynik działania białka Ago [36].

Miejsce aktywne umożliwiające niektórym Ago trawienie mRNA jest zlokalizowane w domenie PIWI. Struktura domeny przypomina budowę RNAzę H, a aktywność katalityczna jest związana z motywem DDX, gdzie X to zazwyczaj kwas asparaginowy lub lizyna [39]. Motyw DDX może być uzupełniany przez kwas glutaminowy tworząc tetraedryczne centrum katalitycznego DEDX [55,84]. Ludzkie Ago3, mimo obecności motywu DDH w domenie PIWI, nie ma aktywności nukleolitycznej, a przyczyna nie została dotąd wyjaśniona [28].

MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE BIAŁEK AGO

Jak większość białek, Ago ulegają modyfikacjom potranslacyjnym wpływającym na ich funkcje, a najbardziej podatnym na modyfikacje jest region łącznikowy L2 [75]. Analiza widm masowych wykazała, że ludzkie Ago2 jest hydroksylowane przez hydroksylazę 4-prolilową, co wpływa na jego stabilność [69]. Pozostałe ludzkie Ago również ulegają hydroksylacji (dotyczy to głównie proliny), przy czym wydaje się, że w większym stopniu dotyczy ona Ago2 i Ago4 niż pozostałych dwóch protein [69]. W warunkach stresu komórkowego ludzkie Ago ulegają też poli-ADP-rybozylacji, co powoduje hamowanie interferencji RNA zależnej od miRNA [45]. Wskazywałoby to na poli-ADP-rybozylację jako główny czynnik regulujący interferencję RNA w cytoplazmie (szczegółowo w [45]).



Białka Ago podlegają ubikwitynacji, która stanowi sygnał do ich degradacji. W literaturze opisano białko TRIM71 jako potencjalną ligazę ubikwitynową oddziałującą na białka Ago u ssaków [74]. Interesujące jest, że białko TRIM71 może też, bezpośrednio przez wiązanie z mRNA, doprowadzić do blokowania jego translacji lub degradacji (niezależnie od białek Argonaute) [50].

Lizyna-402 umiejscowiona w regionie L2 łączącym domeny PAZ i PIWI białka Ago ulega często sumoilacji. Kowalencyjne przyłączanie białek SUMO1 i SUMO2/3 obniża stabilność ludzkiego Ago2 [75].

Fosforylacja białka Ago2 zachodzi zwykle w obrębie seryny-387 [107]. Shane i wsp. wykazali, że katalizowana przez białkową kinazę B (PKB γ /Akt3) fosforylacja hamuje cięcie i zwiększa blokowanie translacji mRNA związanego z miRNA, wskazując na fosforylację jako rodzaj przełącznika między tymi funkcjami [32]. Mutacja polegająca na zamianie ulegającej fosforylacji seryny-387 na alaninę prowadzi do zmniejszenia ilości Ago2 obserwowanego w cytoplazmie w tzw. ciałkach P (processing bodies), w których regulowany mRNA jest gromadzony i może być degradowany z udziałem różnych mechanizmów [73,107].

WIĄZANIE miRNA/siRNA DO KOMPLEKSU RISC

Długie dwuniciowe RNA (dsRNA lub pre-miRNA) prekursorzy siRNA lub miRNA są wiązane przez białko Dicer, które dzięki obecności dwóch domen o charakterze RNAzy III, przecina obie nici generując fragmenty o długości 20-24 nukleotydów [54]. Powstałe krótkie RNA oddysocjują, a następnie ponownie wiążą się z Dicer w innym miejscu [54]. Na tym etapie białko TRBP rozpoznaje mniej stabilny termodynamicznie koniec 5' dwuniciowej cząsteczki miRNA/siRNA i ustawia ją we właściwej pozycji umożliwiającej prawidłową selekcję i wiązanie z Ago [62].

Proces wiązania siRNA/miRNA z białkiem Ago wymaga utrzymania Ago w otwartej konformacji uzyskiwanej z udziałem białka szoku termicznego HSP90 (proces wymaga ATP) [40]. Na podstawie spektrometrii masowej ustalono, że w komórkach mysich podobną funkcję mogą pełnić inne białka opiekuńcze (białko FKBP5 i PTGES), nie stwierdzono jednak czy obecność białek opiekuńczych jest niezbędna do funkcjonowania kompleksu RISC [22]. Badania *Schizosaccharomyces pombe* wskazują na udział kompleksu białek opiekuńczych ARC (Argonaute small interfering RNA chaperone complex) w ładowaniu krótkiego RNA do Ago1 [31].

Po związaniu RNA i usunięciu jednej nici konformacja białka Ago zmienia się, a HSP90 (i białka opiekuńcze) odłączają się od kompleksu [40,54]. Regulacja przez HSP90 jest procesem ewolucyjnie konserwatywnym, który pojawił się prawdopodobnie w tym samym czasie co interferencja RNA [95]. Nie jest pewne czy Dicer jest stałym elementem kompleksu RISC czy też oddysocjo-

wuje po związaniu dupletu krótkiego RNA z białkiem Ago [43].

Rozplatanie dupletu krótkiego RNA odbywa się przez zmiany w konformacji domeny N białka Ago, która przesuując się między nici powoduje ich rozdzielanie [47,91]. Nie wykluczono jednak udziału helikaz [55]. Ludzkie białka Ago1 i Ago2 są zdolne do samodzielnego usuwania z kompleksu nici pasażerskiej, przy czym Ago2 może ją również szybciej usuwać przez trawienie w okolicy 10 nukleotydu [47,91]. Według jednej z hipotez usuwanie nici pasażerskiej u ssaków wymaga obecności kompleksu C3PO (component 3 promoter of RISC) zawierającego białka TB-RBP i TRAX [103]. Procesy związane z usunięciem nici z kompleksu RISC nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione i wymagają dalszych badań. Dodatkowych analiz wymaga również mechanizm funkcjonowania krótkich RNA powstających niezależnie od Dicer, takich jak miR-451, za którego dojrzewanie odpowiedzialne jest prawdopodobnie Ago2 [10,15,22,29,85].

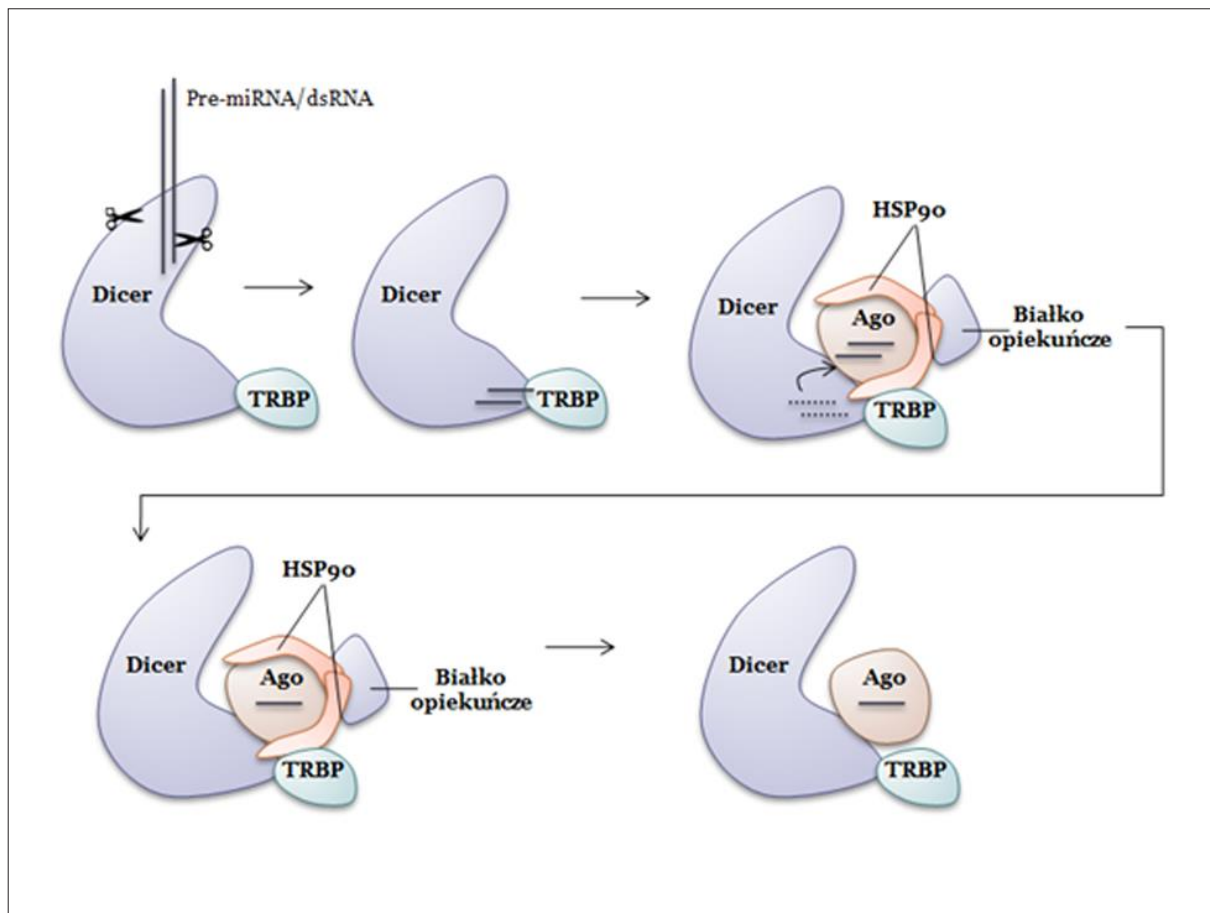
Nic pasażerska nie zawsze ulega degradacji. Znane są wyniki badań świadczące o możliwości włączenia jej do aktywnego kompleksu RISC, gdzie pełni rolę identyczną jak nic wiodąca [63,100]. Analizy danych mikromacierzowych wskazują, że często dotyczy to miRNA związanych z onkogenezą: mir-17, mir-34a, mir-19, mir-29c oraz mir-378 i musi być uwzględniane w badaniach nad funkcjonowaniem i rolą miRNA [102]. Burroughs i wsp. szacują, że około 1% sekwencji wiązanych przez Ago u ssaków to nici pasażerskie, sugerując, że może to świadczyć zarówno o istnieniu istotnego mechanizmu, jak i wyniku z błędów w selekcji nici i jej "ładowaniu" [7].

Ciekawym zjawiskiem jest „efekt Ago3” opisany przez Winter i Diederichsa dotyczący wysoce specyficznej relacji między nicią pasażerską let-7a i ludzkim białkiem Ago3. Ekspresja i aktywność dojrzałej nici pasażerskiej określanej jako let-7a-3p znacznie zwiększa się pod wpływem nadekspresji Ago3. Skutek jest taki sam dla różnych konstruktów generowanych z różnych loci, a reakcja qRT-PCR potwierdza związek nadekspresji Ago3 ze zmianą równowagi między nicią wiodącą i pasażerską (let-7a-5p: let-7a-3p). Żadne inne białko nie wywołuje takiej zmiany, nie jest to również zjawisko swoiste dla jednego typu komórek (analogiczne wyniki uzyskano dla linii komórkowych HEK293 i HeLa). Włączenie nici pasażerskiej do Ago-3 jest niezależne od stabilności końca 5' [100].

SORTOWANIE miRNA/siRNA DO RÓŻNYCH BIAŁEK AGO

Sortowanie i wiązanie krótkich RNA przez poszczególne białka Ago u Eukariontów jest procesem, którego mechanizm nie został jeszcze w pełni zbadany.

U *Drosophila melanogaster* wskazuje się na stopień komplementarności prekursora siRNA/miRNA jako podstawowy dla wiązania przez konkretne Ago. Długie dsRNA wykazujące niemal idealną komplementarność, po cię-



Ryc. 1. Włączenie nici miRNA/siRNA do Ago wymaga wcześniejszego dojrzewania krótkiego RNA katalizowanego przez Dicer, właściwego zorientowania dupletu, selekcji oraz usunięcia jednej z nici

ciu przez enzym Dcr2 wiązane są przez Ago2, natomiast pre-miRNA o większej liczbie niesparowanych nukleotydów po obróbce przez Dcr1 wiążą się z Ago1 [11,88]. Istnieją jednak wyjątki od tej reguły: miR-27 będące produktem obróbki katalizowanej przez Dcr1 wiązane jest przez Ago2, a etapem pośrednim jest prawdopodobnie wiązanie przez Dcr2, które odpowiada za „załadowanie” miRNA do Ago. Opisano też endogenne siRNA wywodzące się z prekursorów o dużej liczbie niesparowań związane z Ago2 [54]. Sugeruje to istnienie dodatkowego mechanizmu sortowania krótkich RNA u *D.melanogaster*.

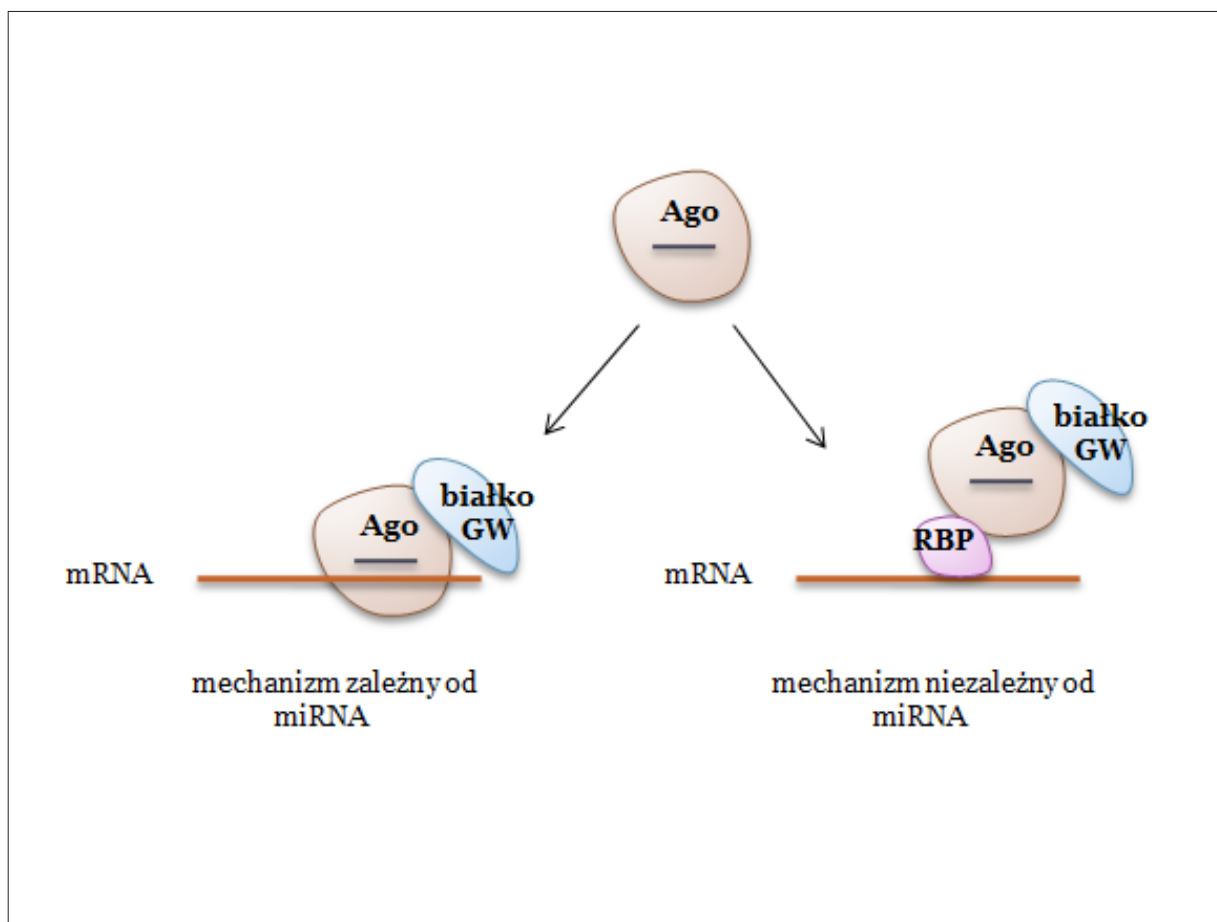
Według Franka i wsp. u *Arabidopsis thaliana* to nukleotydy na końcu 5' dojrzałego miRNA decyduje o sortowaniu małych RNA do odpowiednich białek Ago [19,71]. Ze względu na możliwość wystąpienia w tym miejscu jednego z czterech nukleotydów, przy 10 białkach Ago występujących u *A. thaliana* nie wydaje się by mechanizm oparty wyłącznie na rozpoznawaniu terminalnej zasady z końca 5' krótkiego RNA był decydujący. W odpowiedzi na te wątpliwości Thieme i wsp. zaprezentowali interesujące wyniki, według których dodatkową rolę w sortowaniu mogą odgrywać nukleotydy występujące w pozycjach 2, 6, 9 i 13, wykazując jedno-

cznie, że sortowanie do Ago2 i Ago5 u *A. thaliana* jest zależne od wystąpienia na tych pozycjach uracylu [86]. Potwierdzono również niezależność sortowania od długości miRNA i sparowania dupletu [86].

Dla komórek ssaczych długo obowiązującą hipotezą była zależność sortowania od komplementarności dupletu (mechanizm analogiczny do występującego u *Drosophila*), nie znalazła jednak jak dotąd pełnego potwierdzenia. Głębokie sekwencjonowanie krótkich RNA związanych z ludzkimi Ago przeprowadzone przez zespół Burroughsa wykazało, że w większości są w podobnym stopniu (33%) wiązane przez Ago 1-3 (badania nie obejmowały Ago4). Zaobserwowano kilka wyjątków (miR-182, miR-222 i miR223*), jednak analiza wszystkich wyników wskazuje na brak mechanizmu sortowania [7].

Badania zespołu Wanga potwierdzają hipotezę o losowym wiązaniu miRNA przez białka Ago w komórkach ssaków. Analizy *in vivo* i *in silico* przeprowadzone przez tę grupę wykazały, że w mysich komórkach skóry pozbawionych Ago1 i Ago2, dzięki wzrostowi aktywności Ago3 pula wiążanego miRNA jest na podobnym poziomie co w komórkach kontrolnych [92].





Ryc. 2. Oddziaływanie Ago-mRNA może przebiegać według dwóch schematów: zależnego i niezależnego od miRNA, w tym drugim typie oddziaływania wymagana jest obecność białek RBP [2]

Równocześnie rozpatrywaną teorią jest zależność między termodynamiczną stabilnością prekursora miRNA/siRNA a ich wiązaniem przez Ago. Gu i wsp. wskazują, że krótkie RNA, powstające z prekursora shRNA o mniejszej termostabilności są wydajniej wiązane przez Ago pozbawione właściwości nukleolitycznych (Ago 1, Ago 3 i zmodyfikowane Ago2), co wskazuje, że może być to właściwy kierunek badań. Uzyskane wyniki dotyczą jednak shRNA, natomiast w przypadku siRNA zależność nie jest tak wyraźna [26]. Przeprowadzona przez nasz zespół analiza sekwencji nukleotydowej prekursorów miRNA występujących w kompleksie z białkami Ago1 i Ago2 po immunoprecypitacji [90] wykazała preferencyjne wiązanie przez Ago1 tych miRNA, których prekursorzy zawierały niesparowania w obrębie sekwencji [5].

WIĄZANIE Z DOCELOWĄ SEKWENCJĄ mRNA

Białka Ago związane z krótkim RNA mogą się umiejscawiać i przyłączać do docelowego mRNA według jednego z dwóch schematów. Pierwszy określany jako miRNA-zależny, opiera się na bezpośrednim odnajdywaniu i wiązaniu mikro RNA z komplementarną sekwencją nici mRNA [54]. Do przebiegu tego i kolejnych etapów niezbędna jest obecność białek GW, które koordynują cały

proces [38]. U *D.melanogaster* zidentyfikowano jedno białko GW określane jako GW182, natomiast komórki ssaków zawierają trzy białka nazywane TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C (trinucleotide repeat containing 6) [67]. Charakterystyczną cechą tej rodziny białek jest obecność licznych powtórzeń motywów glicynowo-tryptofanowych w domenie N, oddziałującej z dwoma kieszeniami domeny PIWI białka Ago [109]. Prawdopodobnie jedno białko GW może jednocześnie wiązać więcej niż jedno białko Ago [54]. Glicyna obecna w opisywanym motywie nie jest niezbędna do przebiegu procesu i może być zastąpiona dowolnym aminokwasem o krótkim łańcuchu bocznym (seryna, alanina, cysteina i inne) [67]. Białko TNRC6A paralog GW182 prawdopodobnie odpowiada za kierowanie Ago do jądra [61].

Koniec karboksylowy białka GW zawiera rozpoznający RNA motyw RRM (RNA recognition motif) i motyw PAM2 (poly(A)-binding protein-interacting motif-2) zdolne do oddziaływania z białkiem wiążącym się do ogona poliA (PABPC) mRNA. Następnym takim wiązaniem może być inhibicja reakcji PABPC z kompleksem wiążącym czapkę, uniemożliwiająca cyrkularyzację mRNA i inicjację translacji [106]. Bardziej popularna jest jednak koncepcja, że PABPC i ogon poliA odpowiadają przede

wszystkim za stymulację oddziaływań między białkami Ago i GW, ponieważ długość ogona poliA i liczba związanych z nim PABPC koreluje z wydajnością wyciszania ekspresji genu [58]. Huntzinger i wsp. sugerują że PABPC jest bezpośrednio odpowiedzialne za wiązanie kompleksu RISC z mRNA i wraz z kompleksami deadenylaz PAN2-PAN3 i CCR4-NOT jest konieczne do hamowania translacji i degradacji mRNA [35].

Analizy *in silico* wskazują, że oddziaływania miRNA-mRNA mogą silnie zależeć od stężenia jonów magnezu. Nam i wsp. wykazali zmianę konformacji dupleksu RNA w Ago2 pod wpływem zmiany stężenia Mg^{2+} oraz preferencję aktywności nukleolitycznej nad blokowaniem translacji przy niskich stężeniach jonów [60].

Białka Ago mogą się łączyć z mRNA i spowodować zahamowanie translacji również bez udziału krótkiego RNA. Takie zjawisko potwierdzono dla komórek ludzkich i mysich, w których nie było dojrzałych miRNA mogących się wiązać z kompleksem RISC pozbawionym krótkiego RNA (blokowanie translacji zachodzi mimo braku krótkiego RNA w kompleksie). W tego typu oddziaływaniach Ago-mRNA pośredniczą białka wiążące RNA (RBP), ale prawdopodobny jest również ich udział w wiązaniu mRNA i Ago zawierającego miRNA [21,46,54].

FUNKCJE BIAŁEK AGO

Główne funkcje białek Ago wiążą się z ich rolą w procesie interferencji RNA, w którym przez oddziaływanie z siRNA/miRNA uczestniczą w regulacji ekspresji genów. Proces RNAi zachodzi w cytoplazmie, a regulacja ekspresji odbywa się na poziomie potranskrypcyjnym lub podczas translacji. Rola białek Ago jest jednak bardziej złożona niż początkowo przypuszczano.

W komórkach ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa) białko Ago2 wiąże krótkie RNA powstające w sąsiedztwie dwuniciowych pęknięć DNA (diRNA, double-strand breaks-induced small RNAs) [54,97]. Najnowsze badania wskazują, że Ago 2 związane z diRNA gromadzi się w miejscu wystąpienia takiego uszkodzenia i może aktywnie wpływać na wydajność jego naprawy, oddziałując z Rad51 [23,97]. Białko Ago2 wspiera wiązanie i akumulację Rad51 w obszarze pęknięcia, przyspieszając rekombinację homologiczną. Inne białka zaangażowane w procesy naprawy (Mdc1, RPA, 53BP1) i pozostali przedstawiciele ludzkich Ago nie wykazują podobnej aktywności. Ago2 może brać udział w naprawie dwuniciowych pęknięć również wtedy, gdy nie jest związane z diRNA, jeśli nie jest zachowana jego aktywność katalityczna [23].

Białka Ago są przypuszczalnie zaangażowane w modyfikacje chromatyny i alternatywny splicing przez oddziaływanie z polimerazą RNA II i zdolność do kierowania spliceosomów do miejsc splicingowych [2,4]. Carissimi i wsp. przedstawili dowody na współdziałanie Ago2 z kompleksem SWI/SNF (odpowiedzialnym za zmiany

struktury chromatyny) w regulacji rozmieszczenia nukleosomów w komórkach ludzkich [9]. Mechanizm opiera się na nieznannej wcześniej klasie krótkich RNA nazwanych swiRNA [9]. Analizowana była również rola białek Ago w procesie senescencji. Ago2 akumulowane jest w jądrach komórek wchodzących w stan senescencji, a obniżenie jego poziomu opóźnia proces [72].

Ludzkie Ago 1 oddziałuje z polimerazą II RNA i wiąże się z promotorami aktywnie transkrybowanych genów (Ago 2 nie wykazało podobnych zdolności). Geny, do których wiąże się Ago1 kodują w większości białka uczestniczące w stymulacji wzrostu komórki, cyklu komórkowym i apoptozie, wiele z nich jest zaangażowanych w procesy nowotworzenia. Ten rodzaj regulacji ekspresji zachodzący w jądrze może, ale nie musi być zależny od miRNA [34]. Wyciszenie ekspresji Ago1 w komórkach raka sterca PC-3 powoduje zatrzymanie ich w fazie G0/G1 cyklu komórkowego [34].

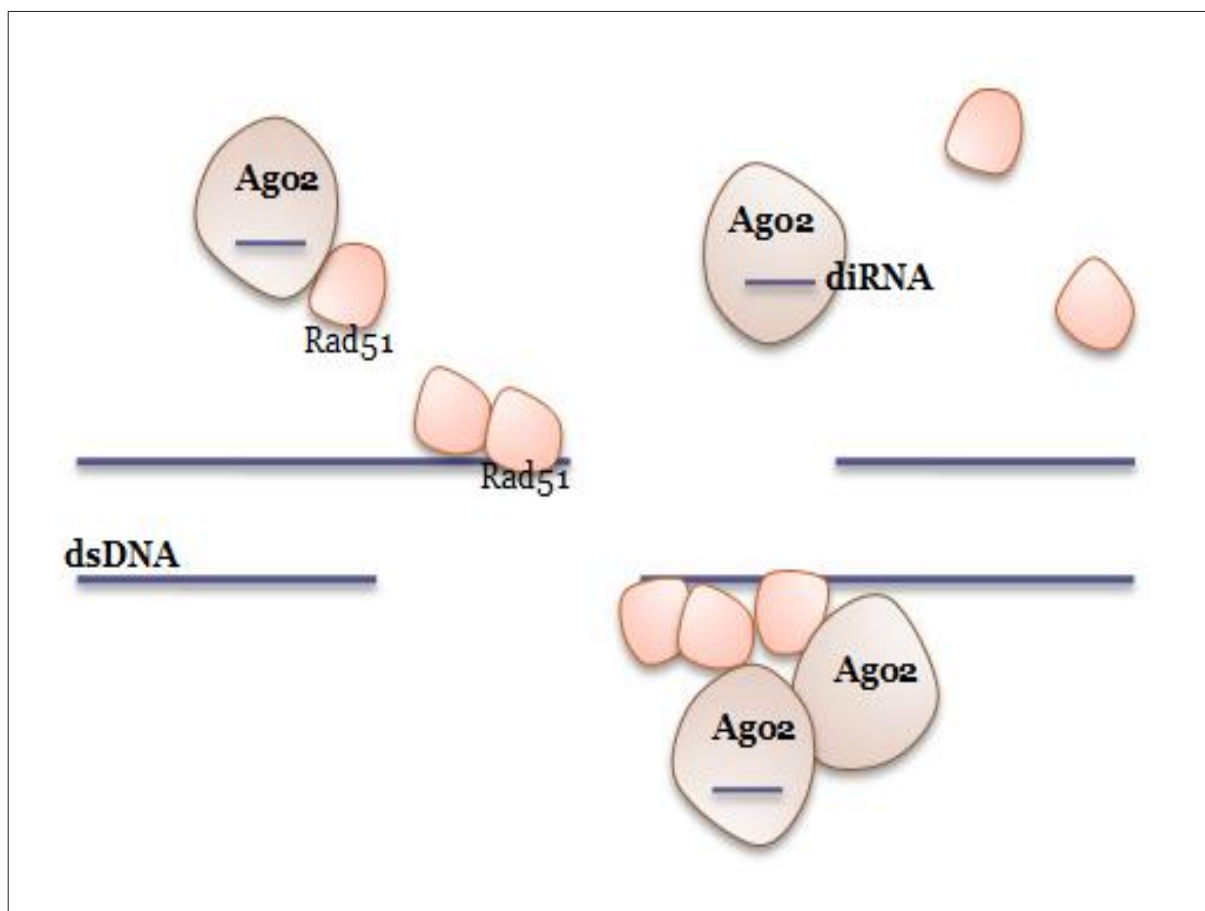
Rolę białek Ago w cyklu komórkowym analizowano również w komórkach drożdży *Schizosaccharomyces pombe*, u których nadekspresja Ago2 powoduje zatrzymanie cyklu w fazie G2, opóźnienie wejścia w mitozę oraz inhibicję importu fosfatazy Cdc25. Stoic i wsp. potwierdzili również zdolność Ago2 do interakcji z białkami 14-3-3 [81]. Natomiast badania nad rozwojem muszki owocówki wykazały, że Ago1 kontroluje cyklinę B i reguluje przebieg cyklu komórkowego. Mutacja Ago1 powoduje wzrost aktywności cykliny B-Cdk1 i obniżenie poziomu białka P53, Grp, Mei-41 i Wee1. Sreerangam i wsp. dowodzą na tej podstawie, że Ago1 jest niezbędne do prawidłowych podziałów mitotycznych, zwłaszcza do tworzenia wrzeciona i segregacji chromosomów w czasie wczesnego rozwoju embrionalnego [68].

INTERAKCJE AGO Z DNA

U prokariotów wykazano, że białka Argonaute biorą udział w interferencji DNA, w której krótkie interferujące DNA wiążąc się z białkiem Argonaute prowadzi do cięcia zarówno pojedynczej jak i podwójnej nici DNA [83,99].

Interakcje Ago-DNA u ssaków to nowe zagadnienie, któremu nie poświęcono dotąd większej uwagi. Wstępne badania wskazują na możliwość związania krótkiego DNA przez domenę MID ludzkiego Ago2, ponieważ nie wykazuje silnych preferencji względem cukru w kwasie nukleinowym [za: 12]. Białko Ago2 *Drosophila melanogaster* ma podobne powinowactwo do ssDNA i ssRNA o długości 21 nukleotydów i tej samej sekwencji, natomiast Ago1 może związać 26-nukleotydowy fragment ssDNA, ale ze znacznie mniejszą wydajnością niż jego jednoniciowy odpowiednik RNA [za: 78]. Smalheiser i Gomes sugerują, że o ile interferencja RNA indukowana przez DNA powinna być brana pod uwagę, o tyle interferencja DNA indukowana przez DNA jest raczej nieprawdopodobna w komórkach eukariotycznych [za: 78].





Ryc. 3. Białko Ago2 uczestniczy w naprawie podwójnoniciowych pęknięć DNA, poprzez gromadzenie i utrzymywanie białka Rad51w miejscu uszkodzenia [97]

PODSUMOWANIE

Białka Ago są niezbędne do regulacji ekspresji genów opartej na krótkich RNA. Mimo wielu nowych danych wiele kwestii związanych z ich funkcjonowaniem pozostaje niewyjaśniona. Pełne zrozumienie procesu inter-

ferencji RNA oraz roli Ago wymaga lepszego poznania mechanizmów interakcji Ago - krótki RNA - mRNA. Dostępne dane i hipotezy często wykluczają się wzajemnie, dotyczy to szczególnie mechanizmów selekcji i usuwania nici z dupleksu oraz sortowania siRNA/miRNA do poszczególnych Ago.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ameres S.L., Horwich M.D., Hung J.H., Xu J., Ghildiyal M., Weng Z., Zamore P.D.: Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science*, 2010; 328: 1534-1539
- [2] Ameyar-Zazoua M., Rachez C., Souidi M., Robin P., Fritsch L., Young R., Morozova N., Fenouil R., Descostes N., Andrau J., Mathieu J., Hamiche A., Ait-Si-Ali S., Muchardt C., Batsche E., Harel-Bellan A.: Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012; 19: 998-1004
- [3] Aravin A.A., Hannon G.J.: Small RNA silencing pathways in germ and stem cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2008; 73: 283-290
- [4] Batsche E., Ameyar-Zazoua M.: The influence of Argonaute proteins on alternative RNA splicing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2015; 6: 141-156
- [5] Biernacki K.: Analiza wpływu struktury miRNA na regulację ekspresji genów. <http://www.zis.ia.polsl.pl/images/dokumenty/ProgramistreszczeniaIIlaskieSpotkaniaNaukowe2015v2.pdf> (25.05.2015)
- [6] Buck A.H., Blaxter M.: Functional diversification of Argonautes in nematodes: an expanding universe. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013; 41: 881-886
- [7] Burroughs A.M., Ando Y., de Hoon M.J., Tomaru Y., Suzuki H., Hayashizaki Y., Daub C.O.: Deep-sequencing of human argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol.*, 2011; 8: 158-177
- [8] Carissimi C., Laudadio I., Cipolletta E., Gioiosa S., Mihailovich M., Bonaldi T., Macino G., Fulci V.: Argonaute2 cooperates with SWI/SNF complex to determine nucleosome occupancy at human transcription start sites. *Nucleic Acids Res.*, 2015; 43: 1498-1512
- [9] Carthew R.W., Sontheimer E.J.: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009; 136: 642-655
- [10] Cheloufi S., Dos Santos C.O., Chong M.M., Hannon G.J.: A Dicer-

independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 2010; 465: 584-589

[11] Czech B., Zhou R., Erlich Y., Brennecke J., Binari R., Villalta C., Gordon A., Perrimon N., Hannon G.J.: Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 2009; 36: 445-456

[12] Deleavey G.F., Frank F., Hassler M., Wisnovsky S., Nagar B., Damha M.J.: The 5' binding MID domain of human Argonaute2 tolerates chemically modified nucleotide analogues. *Nucleic Acid Ther.*, 2013; 23: 81-87

[13] Djikeng A., Shi H., Tschudi C., Ullu E.: RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26 nucleotide RNAs. *RNA*, 2001; 7: 1522-1530

[14] Drinnenberg I.A., Weinberg D.E., Xie K.T., Mower J.P., Wolfe K.H., Fink G.R., Bartel D.P.: RNAi in budding yeasts. *Science*, 2009; 326: 544-550

[15] Dueck A., Ziegler C., Eichner A., Berezikov E., Meister G.: microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 9850-9862

[16] Elkayam E., Kuhn C.D., Tocilj A., Haase A.D., Greene E.M., Hannon G.J., Joshua-Tor L.: The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, 2012; 150: 100-110

[17] Ender C., Meister G.: Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.*, 2010; 123: 1819-1823

[18] Faehnle C., Elkayam E., Haase A.D., Hannon G.J., Joshua-Tor L.: The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. *Cell Rep.*, 2013; 3: 1901-1909

[19] Frank F., Hauver J., Sonenberg N., Nagar B.: *Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.*, 2012; 31: 3588-3595

[20] Frank F., Sonenberg N., Nagar B.: Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 2010; 465: 818-822

[21] Friend K.F., Campbell Z.T., Cooke A., Kroll-Conner P., Wickens M., Kimble J.: A conserved PUF-Ago-eEF1A complex attenuates translation elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012; 19: 176-183

[22] Frohn A., Eberl H.C., Stohr J., Glasmacher E., Rudel S., Heissmeyer V., Mann M., Meister G.: Dicer-dependent and independent Argonaute protein interaction networks in mammalian cells. *Mol. Cell. Proteomics*, 2012; 11: 1442-1456

[23] Gao M., Wei W., Li M.M., Wu Y.S., Ba Z., Jin K.Y., Li M.M., Liao Y.Q., Adhikari S., Chong Z., Zhang T., Guo C.X., Tang T.S., Zhu B.T., Hu X.Z. i wsp.: Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Cell Res.*, 2014; 24: 532-541

[24] Garcia Silva M.R., Tosar J.P., Frugier M., Pantano S., Bonilla B., Esteban L., Serra E., Rovira C., Robello C., Cayota A.: Cloning, characterization, and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene*, 2010; 466: 26-35

[25] Ghildiyal M., Zamore P.D.: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 94-108

[26] Gu S., Jin L., Zhang F., Huang Y., Grimm D., Rossi J.J., Kay M.A.: Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 9208-9213

[27] Guang S., Bochner A. F., Burkhart K.B., Burton N., Pavelec D.M., Kennedy S.: Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature*, 2010; 465: 1097-1101

[28] Hauptmann J., Dueck A., Harlander S., Pfaff J., Merkl R., Meister G.: Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013; 20: 814-817

[29] Haussecker D., Huang Y., Lau A., Parameswaran P., Fire A.Z., Kay M.A.: Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*, 2010; 16: 673-695

[30] Hock J., Meister G.: The Argonaute protein family. *Genome Biol.*, 2008; 9: 2102-2108

[31] Holoch D., Moazed D.: Small-RNA loading licenses Argonaute for assembly into a transcriptional silencing complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015; 22: 328-335

[32] Horman S. R., Janas M. M., Litterst C., Wang B., MacRae I. J., Sever M. J., Morrissey D. V., Graves P., Luo B., Umesalma S., Qi H. H., Miraglia L. J., Novina C. D., Orth A. P.: Akt-mediated phosphorylation of Argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of microRNA targets. *Mol. Cell*, 2013; 50: 356-367

[33] Hosokawa M., Shoji M., Kitamura K., Tanaka T., Noce T., Chuma S., Nakatsuji N.: Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: domain composition, intracellular localization, and function in male germ cells in mice. *Dev. Biol.*, 2007, 301: 38-52

[34] Huang V., Zheng J., Qi Z., Wang J., Place R.F., Yu J., Li H., Li L.C.: Ago1 interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells. *PLoS Gen.*, 2013; 9: e1003821

[35] Huntzinger E., Kuzuoglu-Öztürk D., Braun J. E., Eulalio A., Wohlbold L., Izaurralde E.: The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: 978-994

[36] Hur J.K., Zinchenko M.K., Djuranovic S., Green R.: Regulation of Argonaute slicer activity by guide RNA 3' end interactions with the N-terminal lobe. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 7829-7840

[37] Hutvagner G., Simard M.J.: Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 22-32

[38] Jakymiw A., Lian S., Eystathioy T., Li S., Satoh M., Hamel J.C., Fritzlner M.J., Chan E.K.: Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 1267-1274

[39] Jinek M., Doudna J.A.: A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 2009; 457: 405-412

[40] Johnston M., Geoffroy M.C., Sobala A., Hay R., Hutvagner G.: HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol. Biol. Cell*, 2010; 21: 1462-1469

[41] Kirino Y., Kim N., de Planell-Saquer M., Khandros E., Chiorean S., Klein P.S., Rigoutsos J., Jongens T.A., Mourelatos Z.: Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 652-658

[42] Künne T., Swarts D.C., Brouns S.J.: Planting the seed: target recognition of short guide RNAs. *Trends Microbiol.*, 2014; 22: 74-83

[43] Kurzynska-Kokorniak A., Koralewska N., Pokornowska M., Urbanowicz A., Tworak A., Mickiewicz A., Figlerowicz M.: The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res.*, 2015; 9: 4365-4380

[44] Kwak P.B., Tomari Y.: The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012; 19: 145-151

[45] Leung A.K., Vyas S., Rood J.E., Bhutkar A., Sharp P.A., Chang P.: Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol. Cell*, 2011; 42: 489-499

[46] Leung A.K., Young A.G., Bhutkar A., Zheng G.X., Bosson A.D., Nielsen C.B., Sharp P.A.: Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011; 18: 237-244

[47] Leushner P.J., Ameres S.L., Kueng S., Martinez J.: Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.*, 2006; 7: 314-320



- [48] Li S.C., Tang P., Lin W.C.: Intronic micro-RNA: discovery and biological implications. *DNA Cell Biol.*, 2007; 26: 195-207
- [49] Lingel A., Simon B., Izaurralde E., Sattler M.: Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004; 11: 576-577
- [50] Loedige I., Gaidatzis D., Sack R., Meister G., Filipowicz W.: The mammalian TRIM-NHL protein TRIM71/LIN-41 is a repressor of mRNA function. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: 518-532
- [51] Luteijn M.J., Ketting R.F.: PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat. Rev. Genet.*, 2013; 14: 523-534
- [52] Ma J.B., Ye K., Patel D.J.: Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 2004; 429: 318-322
- [53] Ma J.B., Yuan Y.R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D.J.: Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 2005; 434: 666-670
- [54] Meister G.: Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev.*, 2013; 14: 447-459
- [55] Meister G., Landthaler M., Peters L., Chen P. Y., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T.: Identification of novel Argonaute-associated proteins. *Curr. Biol.*, 2005; 15: 2149-2155
- [56] Mi S., Cai T., Hu Y., Chen Y., Hodges E., Ni F., Wu L., Li S., Zhou H., Long C., Chen S., Hannon G.J., Qi Y.: Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 2008; 133: 116-127
- [57] Mochizuki K., Gorovsky M.A.: A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Gene Dev.*, 2005; 19: 77-89
- [58] Moretti F., Kaiser C., Zdanowicz-Specht A., Hentze M.: PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012; 19: 603-608
- [59] Nakanishi K., Weinberg D.E., Bartel D.P., Patel D.J.: Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 2012; 486: 368-374
- [60] Nam S., Ryu H., Son W.J., Kim Y.H., Kim K.T., Balch C., Nephew K.P., Lee J.: Mg²⁺ effect on argonaute and RNA duplex by molecular dynamics and bioinformatics implications. *PLoS One*, 2014; 9: e109745
- [61] Nishi K., Nishi A., Nagasawa T., Ui-Tei K.: Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA*, 2013; 19: 17-35
- [62] Noland C.L., Ma E., Doudna J.A.: siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Mol. Cell*, 2011; 43: 110-121
- [63] Okamura K., Phillips M.D., Tyler D.M., Duan H., Chou Y.T., Lai E.C.: The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008; 15: 354-363
- [64] Oliver C., Santos J.L., Pradillo M.: On the role of some Argonaute proteins in meiosis and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, 2014; 5: 1-10
- [65] Olovnikov I., Chan K., Sachidanandam R., Newman D.K., Aravin A.A.: Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol. Cell*, 2013; 51: 594-605
- [66] Peters L., Meister G.: Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell*, 2007; 26: 611-623
- [67] Pfaff J., Hennig J., Herzog F., Aebersold R., Sattler M., Niessing D., Meister G.: Structural features of Argonaute GW182 protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: E3770-E3779
- [68] Pushpavalli S.N., Sarkar A., Bag I., Hunt C.R., Ramaiah M.J., Pandita T.K., Bhadra U., Pal-Bhadra M.: *Argonaute-1* functions as a mitotic regulator by controlling *Cyclin B* during *Drosophila* early embryogenesis. *FASEB J.*, 2014; 28: 655-666
- [69] Qi H., Ongusaha P.P., Myllyharju J., Cheng D., Pakkanen O., Shi Y., Lee S.W., Peng J., Shi Y.: Prolyl-4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature*, 2008; 455: 421-424
- [70] Reuter M., Chuma S., Tanaka T., Franz T., Stark A., Pillai R.S.: Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 639-646
- [71] Rogers K., Chen X.: Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 2013; 25: 2383-2399
- [72] Ross J.P., Kassir Z.: The varied roles of nuclear argonaute-small RNA complexes and avenues for therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014; 3: e203
- [73] Rüdell S., Meister G.: Phosphorylation of Argonaute proteins: regulating gene regulators. *Biochem. J.*, 2008; 413: e7-e9
- [74] Rybak A., Fuchs H., Hadian K., Smirnova L., Wulczyn E.A., Michel G., Nitsch R., Krappmann D., Wulczyn F.G.: The *let-7* target gene mouse *lin-41* is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 1411-1420
- [75] Sahin U., Lapaquette P., Andrieux A., Faure G., Dejean A.: Sumoylation of human Argonaute 2 at lysine-402 regulates its stability. *PLoS One*, 2014; 9: e102957
- [76] Schirle N.T., MacRae I.J.: The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, 2012; 336: 1037-1040
- [77] Shi H., Tschudi C., Ullu E.: An unusual Dicer-like 1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, 2006; 12: 2063-2072
- [78] Smalheiser N.R., Gomes O.L.: Mammalian Argonaute-DNA binding? *Biol. Direct*, 2014; 9: 27
- [79] Smbirt P., Yang S.Jr., Azzam G., Liu J.L., Lai E.C.: Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013; 20: 789-795
- [80] Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L.: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004; 305: 1434-1437
- [81] Stoica C., Carmichael J.B., Parker H., Pare J., Hobman T.C.: Interactions between the RNA interference effector protein Ago1 and 14-3-3 proteins: consequences for cell cycle progression. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 37646-37651
- [82] Swarts D.C., Jore M.M., Westra E.R., Zhu Y., Janssen J.H., Snijders A.P., Wang Y., Patel D.J., Berenguer J., Brouns S.J., van der Oost J.: DNA-guided DNA interference by prokaryotic Argonaute. *Nature*, 2014; 507: 258-261
- [83] Swarts D.C., Koehorst J.J., Westra E.R., Schaap P.J., van der Oost J.: Effects of Argonaute on gene expression in *Thermus thermophilus*. *PLoS One*, 2015; 10: e0124880
- [84] Swarts D.C., Makarova K., Wanyg Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E.V., Patel D.J., van der Oost J.: The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2014; 21: 743-753
- [85] Taft R.J., Glazov E.A., Lassmann T., Hayashizaki Y., Carninci P., Mattick J.S.: Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA*, 2009; 15: 1233-1240
- [86] Thieme C.J., Schudoma C., May P., Walther D.: Give it AGO: the search for miRNA-Argonaute sorting signals in *Arabidopsis thaliana* indicates a relevance of sequence positions other than the 5'-position alone. *Front. Plant Sci.*, 2012; 3: 1-15
- [87] Thomson D.W., Pillman K.A., Anderson M.L., Lawrence D.M., Toubia J., Goodall G.J., Bracken C.P.: Assessing the gene regulatory properties of Argonaute-bound small RNAs of diverse genomic origin. *Nucleic Acids Res.*, 2015; 43: 470-481

- [88] Tomari Y., Du T., Zamore P.D.: Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell*, 2007; 130: 299-308
- [89] Tschudi C., Shi H., Franklin J.B., Ullu E.: Small interfering RNA-producing loci in the ancient parasitic eukaryote *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics*, 2012; 13: 427
- [90] Turchinovich A., Burwinkel B.: Distinct Ago1 and Ago2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.*, 2012; 9: 1066-1075
- [91] Wang B., Li S., Qi H.H., Chowdhury D., Shi Y., Novina C.D.: Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 1259-1266
- [92] Wang D., Zhang Z., O'Loughlin E., Lee T., Houel S., O'Carroll D., Tarakhovskiy A., Ahn N.G., Yi R.: Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes Dev.*, 2012; 26: 693-704
- [93] Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T., Patel D.J.: Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 2008; 456: 921-926
- [94] Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Wardle G.S., Tuschl T., Patel D.J.: Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 2009; 461: 754-761
- [95] Wang Y., Mercier R., Hobman T.C., LaPointe P.: Regulation of RNA interference by Hsp90 is an evolutionarily conserved process. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 2673-2681
- [96] Wedeles C., Wu M.Z., Claycomb J.M.: Protection of germline gene expression by the *C. elegans* Argonaute CSR-1. *Dev. Cell*, 2013; 27: 664-671
- [97] Wei W., Ba Z., Gao M., Wu Y., Ma Y., Amiard S., White C.I., Rendtlew Danielsen J.M., Yang Y.G., Qi Y.: A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*, 2012; 149: 101-112
- [98] Williams A.E.: Functional aspect of animal microRNAs. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008; 65: 545-562
- [99] Willkomm S., Zander A., Gust A., Grohmann D.: A prokaryotic twist on Argonaute function. *Life*, 2015; 5: 538-553
- [100] Winter J., Diederichs S.: Argonaute-3 activates the let-7a passenger strand microRNA. *RNA Biol.*, 2013; 10: 1631-1643
- [101] Woolnough J.L., Atwood B.L., Giles K.E.: Argonaute2 binds directly to tRNA genes and promotes gene repression in *cis*. *Moll. Cell. Biol.*, 2015; 35: 2278-2294
- [102] Yang J.S., Phillips M.D., Betel D., Mu P., Ventura A., Siepel A.C., Chen K.C., Lai E.C.: Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*, 2011; 17: 312-326
- [103] Ye X., Huang N., Liu Y., Paroo Z., Huerta C., Li P., Chen S., Liu Q., Zhang H.: Structure of C3PO and mechanism of HUMAN RISC activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011; 18: 650-657
- [104] Yigit E., Batista P.J., Bei Y., Pang K.M., Chen C.C., Tolia N.H., Joshua-Tor L., Mitani S., Simard M.J., Mello C.C.: Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonaute family act sequentially during RNAi. *Cell*, 2006; 127: 747-757
- [105] Yuan Y.R., Pei Y., Ma J.B., Kuryaviy V., Zhadina M., Meister G., Chen H.Y., Dauter Z., Tuschl T., Patel D.J.: Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell*, 2005; 19: 405-419
- [106] Zekri L., Huntzinger E., Heimstädt S., Izaurralde E.: The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 6220-6231
- [107] Zeng Y., Sankala H., Zhang X., Graves P.R.: Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J.*, 2008; 413: 429-436
- [108] Zhu L., Masaki Y., Tatsuke T., Li Z., Mon H., Xu J., Lee J.M., Kusakabe T.: A MC motif in silkworm Argonaute 1 is indispensable for translation repression. *Insect Mol. Biol.*, 2013; 10: 1-11
- [109] Zisoulis D.G., Lovci M.T., Wilbert M.L., Hutt K.R., Liang T.Y., Pasquinelli A.E., Yeo G.W.: Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010; 17: 173-179

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

