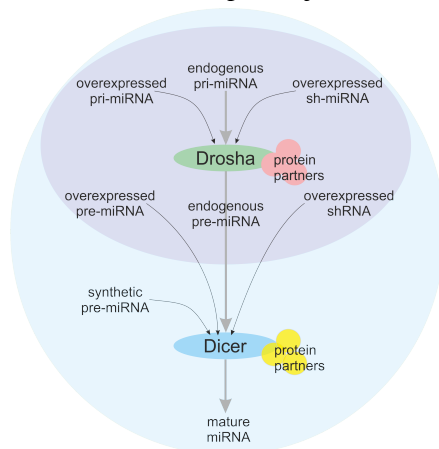


## Obrazowanie szlaku biogenezy miRNA i komórkowej lokalizacji reagentów technologii interferencji RNA

Regulacja ekspresji genów może przebiegać na wielu etapach. Pierwszym z nich jest regulacja aktywności transkrypcyjnej genów poprzez sekwencje regulatorowe, kolejne etapy obejmują regulację potranskrypcyjnej obróbki pierwotnego transkryptu, blokowanie translacji, wzmożoną degradację transkryptu czy selektywną aktywację lub dezaktywację białek. Bardzo ważnym etapem regulacji na poziomie mRNA jest mechanizm interferencji RNA w ramach którego krótkie, około 20 nukleotydowe, cząsteczki RNA zwane mikroRNA (miRNA) oddziałują z transkrypcją prowadząc do inhibicji translacji poprzez degradację mRNA lub niezależnie od niej.

Cząsteczki miRNA powstają w kilkuetapowym procesie biogenezy miRNA w który zaangażowanych jest wiele białek.



Pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA) podlega cięciu przez RNazę Droszę na terenie jądra komórkowego. Produkt cięcia, około 60 nt prekursor pre-miRNA, jest eksportowany z wykorzystaniem eksportyny-5 do cytoplazmy. W cytoplazmie pre-miRNA podlega drugiemu etapowi obróbki, w który zaangażowana jest RNaza Dicer, która docina pre-miRNA do dwuciniowego miRNA/miRNA\* długości około 20 nt. Dojrzałe miRNA włączone do kompleksu miRISC oddziałują z docelowymi transkryptami.

Naturalny szlak biogenezy miRNA został wykorzystany w technologii interferencji RNA (RNAi) do selektywnej regulacji ekspresji genów zarówno w badaniach podstawowych w celu poznania funkcji genów, jak również w projektowaniu terapii genowej. W technologii RNAi wykorzystywane są różne typy reagentów, siRNA odpowiadające miRNA, shRNA - pre-miRNA i sh-miRNA - pri-miRNA.

W celu lepszego poznania procesu biogenezy miRNA oraz technologii interferencji RNA wykorzystamy w projekcie metody mikroskopowe dodając do

aktualnego stanu wiedzy aspekt lokalizacyjny oraz dynamiczny dwóch głównych etapów biogenezy miRNA: cięcia przez RNasę Droszę w obrębie nukleoplazmy oraz cięcia przez RNasę Dicer w cytoplazmie.

Zdobyta w projekcie wiedza pozwoli udzielić odpowiedzi na pytania: Gdzie lokalizują prekursorzy miRNA? W jakim stopniu prekursorzy miRNA są rozpoznawane przez białka biogenezy miRNA? Jaki wpływ na lokalizację i procesing ma struktura prekursorów miRNA? Jaki wpływ na lokalizację ma poziom ekspresji prekursorów miRNA? Jaki wpływ na lokalizację i rozpoznawanie przez białka biogenezy miRNA ma sposób wprowadzania cząsteczek pre-miRNA i shRNA do komórek? Jakie są różnice w lokalizacji komórkowej między endogennymi prekursorami miRNA a ich egzogennymi odpowiednikami z technologii interferencji RNA? Odpowiedzi na te pytania pozwolą na lepsze zrozumienie procesu biogenezy miRNA. Projekt dostarczy również nowych narzędzi eksperymentalnych i bioinformatycznych do badań nad biogenezą miRNA oraz technologią interferencji RNA. W dalszej perspektywie informacje dotyczące struktury i ekspresji prekursorów miRNA oraz egzogennych shRNA i sh-miRNA mogą przyczynić się do dalszego rozwoju technologii interferencji RNA i bardziej racjonalnego projektowania reagentów w podejściach terapeutycznych.