

Niepoznane obszary aktywności ludzkiej rybonukleazy Dicer

Rybonukleaza Dicer najczęściej omawiana jest w kontekście procesu biogenezy krótkich regulatorowych RNA (ang. small regulatory RNA, srRNA), takich jak mikroRNA (miRNA) czy małe interferujące RNA (ang. small interfering RNA, siRNA). Podczas biogenezy miRNA Dicer wycina dupleksy, zawierające funkcjonalne miRNA, z prekursorów przyjmujących strukturę typu spinki do włosów, zwanych pre-miRNA. Substratami Dicer są również dsRNA, z których enzym uwalnia dupleksy siRNA. SrRNA pełnią kluczową rolę w procesach rozwojowych, w powstawaniu wyspecjalizowanych komórek, tkanek i narządów, a także w programowanej śmierci komórek. U człowieka większość srRNA to miRNA. Częsteczki te, jak się przypuszcza, biorą udział w kontroli ekspresji większości ludzkich genów. Co ciekawe, wykazano, iż cząsteczki miRNA pełnią również istotną funkcję w procesie oddziaływania pomiędzy gospodarzem i wirusem podczas infekcji wirusowych u ssaków. Poziom akumulacji miRNA jest ściśle regulowany i specyficzny dla określonego typu komórek czy tkanek, podczas ich każdego stadium rozwojowego. Jakikolwiek zaburzenia i odchylenia od prawidłowego, fizjologicznego poziomu miRNA w komórce mogą uruchamiać szereg niekorzystnych procesów, np. nowotworowych, degeneracyjnych czy zaburzeń rozwojowych, prowadzących do dysfunkcji narządów i organów, a często śmierci organizmu.

Podobnie jak w przypadku miRNA, poziom akumulacji rybonukleazy Dicer musi być ściśle regulowany. Niestety, pomimo wielu lat intensywnych badań ciągle niewiele wiemy na temat mechanizmów regulujących aktywność tej rybonukleazy. Bez wątplenia najlepiej poznana grupą regulatorów Dicer są jej partnerzy białkowi, natomiast niewiele wiadomo na temat czynników niebiałkowych, które potencjalnie mogą regulować aktywność tego enzymu, np. kwasów nukleinowych. **Badania zapoczątkowane w naszym zespole badawczym pozwoliły ustalić, iż aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer może być regulowana przez cząsteczki RNA, inne niż jej substraty, specyficznym wiążąc się z tym enzymem.** Znanymi przykładami regulacji aktywności Dicer za pomocą RNA jest sekwestracja tej rybonukleazy przez endogenne bądź wirusowe transkrypty. Analiza transkryptomu człowieka pozwoliła na zidentyfikowanie tzw. rejonów pasywnych Dicer, sekwencji RNA przyjmujących struktury typu spinki do włosów i wiążących Dicer. Miejsca te zlokalizowane są zazwyczaj w rejonach kodujących transkryptów oraz w rejonach nie ulegających translacji, na końcu 3' transkryptu. Wykazano, iż Dicer może rozpoznawać i wiązać takie sekwencje; co więcej, po ich związaniu nie dochodzi do przecinania transkryptu przez Dicer (stąd nazwa tych sekwencji). Rejony pasywne pełnią zatem funkcję swoistych rezerwuarów, kontrolujących poziom aktywnej rybonukleazy Dicer w cytoplazmie poprzez sekwestrację enzymu. Wiadomo również, iż podobny mechanizm sekwestracji wykorzystują niektóre wirusy, np. adenowirusy produkujące RNA, który przyjmuje strukturę typu spinki do włosów. Częsteczki te wiążą rybonukleazę Dicer, tym samym uniemożliwiając produkcję regulatorowych miRNA, hamujących replikację wirusa. Ponadto, badania przeprowadzone w naszym zespole badawczym wykazały, iż aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer (hDicer) może być regulowana przez cząsteczki RNA specyficznym wiążąc się z tym enzymem. W puli potencjalnych inhibitorów hDicer, wyłonionych w procesie selekcji RNA *in vitro*, znaleźliśmy oligomery RNA, które w podobny sposób hamowały proces dojrzewania wielu badanych miRNA (inhibitory uniwersalne). Zidentyfikowaliśmy również cząsteczki, które działały w sposób wybiórczy, selektywny – oligomery hamujące powstawanie określonych cząsteczek miRNA i niemające wpływu na proces dojrzewania innych regulatorowych RNA. Ponadto, udało nam się ustalić, iż za proces selektywnej inhibicji powstawania określonych cząsteczek miRNA odpowiedzialne są oddziaływania pomiędzy prekursorami danych miRNA oraz odpowiednimi oligomerami RNA. Pokazaliśmy również, że zidentyfikowane cząsteczki inhibitorowe są aktywne zarówno w warunkach *in vitro*, jak i w warunkach komórkowych. Dalsze badania wykazały, iż cząsteczki RNA regulujące aktywność hDicer mogą być zakodowane w transkrypcyjnie aktywnych rejonach genomu człowieka.

W ramach realizacji niniejszego projektu chcielibyśmy scharakteryzować pule komórkowych RNA mogących wpływać na aktywność hDicer. Zamierzamy odpowiedzieć na pytania: czy cząsteczki te są komórkowo/tkankowo-specyficzne i czy mogą działać w sposób selektywny, tzn. czy mogą wpływać na proces biogenezy określonych miRNA?

Coraz częściej pojawiają się doniesienia literaturowe opisujące nowe funkcje Dicer, niepowiązanie z procesem biogenezy miRNA, np. udział w procesach zapalnych, czy w procesie fragmentacji chromosomowego DNA podczas apoptozy. Co ciekawe, wyniki najnowszych badań prowadzonych w naszym zespole badawczym wskazują, iż Dicer może pełnić funkcję charakterystyczną dla białek opiekuńczych. Ponadto, dane literaturowe, a także wyniki naszych wstępnych badań wskazują, iż „dodatkowe” funkcje rybonukleazy Dicer mogą być powiązane z występowaniem różnych wariantów transkrypcyjnych genu Dicer oraz skróconych form tego białka.

Kolejne problemy, które zamierzamy rozwiązać, dotyczą zatem identyfikacji różnych form hDicer w komórkach ludzkich, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, charakterystyki ich aktywności oraz próby ustalenia jakie funkcje mogą pełnić różne formy hDicer w wybranych typach komórek ludzkich.

Biorąc pod uwagę dane literaturowe oraz wyniki naszych dotychczasowych badań, sądzimy, iż oddziaływanie Dicer z innymi białkami czy też regulatorowymi RNA, a także występowanie różnych wariantów Dicer to niektóre ze sposobów/mechanizmów umożliwiających regulację aktywności i specyficzności enzymatycznej Dicer. Innymi słowy, wspomniane czynniki mogą wpływać na los Dicer i decydować czy Dicer będzie uczestniczyła w procesie biogenezy miRNA, czy też białko to będzie zaangażowane w inne szlaki komórkowe?

Jesteśmy przekonani, iż realizacja tak zarysowanego projektu będzie miała istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. Identyfikacja nowych cząsteczek RNA, regulujących aktywność Dicer, dostarczy cennych informacji na temat strukturalnych uwarunkowań procesu biogenezy miRNA. Dodatkowo, przypisanie nowych, dotychczas niepoznanych funkcji rybonukleazie Dicer umożliwi lepsze poznanie mechanizmu działania tego enzymu. Z drugiej strony, zdefiniowanie nowej puli cząsteczek regulatorowych otworzy drogę do opracowania nowych, specyficznych metod terapeutycznych, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, czy zakaźnych.