

Celem projektu jest wyjaśnienie, w jaki sposób cząsteczki mikroRNA (miRNA) powstają z cząsteczek RNA, nazywanych prekursorowymi, u roślin. Dokonać tego zamierzam przede wszystkim przy pomocy technik biologii strukturalnej, a więc takich, które pozwalają na stworzenie modelu trójwymiarowej struktury badanej cząsteczki lub kompleksu złożonego z cząsteczek. Niektóre z tych technik umożliwiają również zbadanie dynamiki cząsteczek, czyli ich ruchów oraz zmian struktury, wynikających z elastyczności cząsteczek.

Pierwszą prekursorową cząsteczką RNA, powstającą w drodze transkrypcji genu miRNA, jest pri-miRNA. Na skutek przecięcia powstaje z niej pre-miRNA. Dwa lub więcej kolejnych cięć jest koniecznych, aby uwolnić z pre-miRNA dojrzałe miRNA. Cięć tych dokonuje białko DCL1, aby jednak zachodziły w odpowiednich miejscach w obrębie RNA, niezbędna jest pomoc białka HYL1 oraz białka SERRATE. Trzy wymienione białka oraz prekursorowe RNA fizycznie ze sobą oddziałują i tworzą kompleks odpowiedzialny za biogenezę miRNA u rośliny, którą zostanie wykorzystana jako model badawczy – rozdkiwnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*). Główna hipoteza badawcza leżąca u podstaw projektu zakłada, że białka HYL1 oraz SERRATE, dzięki przyłączaniu się do charakterystycznych elementów w strukturze RNA, tworzą rodzaj rusztowania dla białka DCL1, naprowadzając je na odpowiednie miejsca cięcia w obrębie prekursorowego RNA. Aby ją sprawdzić, posłużę się w pierwszej kolejności pomiarem małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS) przez cząsteczki lub ich kompleksy obecne w roztworze. Otrzymany wzór rozpraszania pozwala uzyskać kilka istotnych informacji, min. oszacować wielkość i stopień elastyczności badanego obiektu (cząsteczki lub kompleksu) oraz liczbę składników tworzących kompleks. Na podstawie wzoru rozpraszania stworzyć można trójwymiarowy model struktury badanego obiektu o niskiej rozdzielczości. Oczekuję, iż metoda SAXS pozwoli stwierdzić, ile kopii białek HYL1 oraz SERRATE przyłącza się do cząsteczki prekursora miRNA oraz w których jego miejscach. Metoda ta szczególnie dobrze nadaje się także do badania zmian struktury cząsteczek.

Aby dodać wiarygodności wynikom otrzymanym dzięki wyżej opisanym pomiarom, zamierzam przeprowadzić eksperymenty biochemiczne, zwane „odciskiem palca” lub „odciskiem stopy”. Pozwalają one stwierdzić, które rejony RNA chronione są przez przyłączone do nich białko przed działaniem enzymów. Podejmę także próby otrzymania kompleksów zbudowanych z prekursora miRNA oraz wymienionych białek w formie kryształu. Dzięki temu możliwe byłoby stworzenie modelu o rozdzielczości pozwalającej na rozróżnienie pojedynczych atomów, a więc zbadanie architektury kompleksów z bardzo dużym stopniem szczegółowości. Uzyskanie takiego kryształu jest jednak bardzo wymagającym zadaniem.

Wyniki badań obejmowanych przez projekt pozwolą lepiej zrozumieć podstawy jednego z najważniejszych dla roślin procesów regulujących ekspresję genów, a więc poziom RNA i białek. Mogą pomóc wyjaśnić, skąd biorą się niektóre nieprawidłowości tego procesu. Niewykluczone, że dostarczą wiedzy o tym, jak wpływać na powstawanie i działanie cząsteczek miRNA.

Kompleks odpowiedzialny za powstawanie miRNA wykonuje złożone zadanie, prawie nie popełniając przy tym błędów. Robi to w dynamicznym środowisku, w którym wszystkie cząsteczki wykonują przypadkowe ruchy. Zrozumienie, jak jest to możliwe, wzbogaci naszą wiedzę na temat fizycznych i chemicznych podstaw funkcjonowania komórki. Może także wspomóc nanotechnologię w projektowaniu i tworzeniu maszyn molekularnych, wykonujących żądane przez nas zadania.