

STRESZCZENIE POPULARNONAUKOWE

Replikacja DNA to proces, w trakcie którego materiał genetyczny (genom) komórki zostaje powielony w przygotowaniu na rozdział na dwie komórki potomne, umożliwiając rozmnażanie organizmu lub jego rozwój od etapu embrionalnego. Z punktu widzenia zdrowia organizmu kluczowe jest, by genom był pozbawiony wszelkich uszkodzeń, a jego replikacja odbywała się z najwyższą wiernością. DNA to dwuniciowa cząsteczka zbudowana z deoksyrybonukleotydów, w składzie których występuje m.in. cukier (deoksyryboza) i zasada azotowa (adenina, guanina, tymina lub cytozyna). Kolejność zasad azotowych w łańcuchu stanowi właściwą „treść” DNA. DNA transkrybowany jest na RNA, którego główną cechą odmienną jest inny cukier – ryboza – w składzie. RNA natomiast tłumaczony jest na białka, a o ich budowie decyduje sekwencja deoksyrybonukleotydów w DNA. W związku z tym DNA decyduje o wzroście, kolorze włosów i wielu innych istotnych cechach człowieka, w tym zdrowiu.

Replikacja DNA prowadzona jest przez wyspecjalizowane białka, tzw. polimerazy DNA. W trakcie replikacji polimerazy DNA przyłączają deoksyrybonukleotydy do nowo powstającego łańcucha, jako matrycy używając jednej z nici rodzicielskich (dwie polimerazy DNA replikują jednocześnie na matrycy dwóch nici rodzicielskich, dając początek dwóm dwuniciowym cząsteczkom). Polimerazy DNA muszą tak wybierać deoksyrybonukleotydy, by zapewnić właściwe parowanie zasad azotowych (adenina „pasuje” tylko do tyminy, a cytozyna do guaniny). Błędy podczas replikacji (np. sparowanie adeniny z guaniną) mogą prowadzić do powstawania mutacji genetycznych, które w większości przypadków mają negatywne skutki dla zdrowia organizmu. Nie zdarza się to jednak często – polimerazy DNA są znacznie bardziej dokładne niż jakiegokolwiek urządzenie stworzone przez człowieka (1 błąd na 10 mln sparowanych zasad).

W ciągu ostatniej dekady wykazano, że znacznie (nawet 1000-krotnie) częściej niż niewłaściwie sparowane deoksyrybonukleotydy, polimerazy DNA wstawiają do genomu rybonukleotydy (materiał budulcowy RNA). Rybonukleotydy są najczęściej występującym uszkodzeniem DNA, a ich liczba w genomie ludzkim w ciągu jednego cyklu replikacji sięga 1 mln. Jak wykazano w trakcie wieloletnich badań, rybonukleotydy w DNA, jeśli nieusunięte, mogą prowadzić do rozległych uszkodzeń, w tym pęknięć genomu, wpływać negatywnie na różne procesy komórkowe, a nawet prowadzić do rozwoju chorób genetycznych, nowotworów, a także śmierci na etapie zarodkowym. Z tego powodu komórki wykształciły wyspecjalizowane systemy zdolne do rozpoznawania i usuwania rybonukleotydów z DNA.

Wiadomo, że organizmy bakteryjne są bardziej odporne na negatywne skutki obecności rybonukleotydów w DNA, co stwarza możliwość wykorzystania ich do dogłębnego zbadania mechanistycznych podstaw inkorporacji rybonukleotydów do DNA i ścieżek odpowiedzialnych za ich usuwanie. Badania z wykorzystaniem pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) jako organizmu modelowego wykazały, że obydwie nici DNA replikowane są z różną dokładnością; innymi słowy, częstość powstawania mutacji genetycznych na obu niciach DNA nie jest jednakowa. W związku z tym, celem przedstawionego projektu jest zbadanie:

- czy inkorporacja rybonukleotydów do DNA ma wpływ na wierność replikacji obu nici;
- czy liczba rybonukleotydów wstawianych do obu nici DNA jest jednakowa;
- jakie systemy są zaangażowane w usuwanie rybonukleotydów z genomu i czy wydajność ich działania jest różna na obu niciach DNA;
- jakie mogą być konsekwencje dla procesów komórkowych, gdy rybonukleotydy nie są usunięte z DNA?

Jako główne narzędzie badawcze wykorzystany zostanie zmutowany wariant polimerazy DNA charakteryzujący się podwyższoną częstością wstawiania rybonukleotydów do DNA. W ramach realizacji projektu zaplanowano:

- analizę spektrum mutacji genetycznych na obu niciach DNA w celu potwierdzenia obserwowanej specyficzności niciowej systemów usuwania rybonukleotydów;
- bezpośrednie oszacowanie ilości rybonukleotydów w DNA w warunkach inaktywacji różnych systemów usuwania rybonukleotydów (spodziewane jest zaobserwowanie znacznego wzrostu liczby rybonukleotydów w DNA);
- poszukiwanie, metodami genetycznymi i biochemicznymi, nowych systemów, które mogą być zaangażowane w usuwanie rybonukleotydów (wyniki wstępne wskazują, że potencjalnym kandydatem jest aktywność korektorska głównej replikazy odpowiedzialnej za replikację obu nici DNA);
- zbadanie ilości powstających jednoniciowych fragmentów DNA, wskazujących na problemy z utrzymaniem ciągłości replikacji (spodziewana duża ilość jednoniciowego DNA w warunkach inaktywacji systemów naprawy rybonukleotydów, zgodnie z wynikami wstępnymi sugerującymi zaburzenia procesu replikacji).

Uzyskane wyniki znacznie poszerzą wiedzę na temat ścieżek usuwania rybonukleotydów, ich znaczenia ewolucyjnego oraz możliwych konsekwencji ich nieprawidłowego działania.