

Komórkowa sieć oddziaływań pomiędzy RNA i domeną helikazową rybonukleazy Dicer człowieka

Odkrycie zjawiska wyciszania ekspresji genów zależnego od krótkich cząsteczek RNA: microRNA (miRNA) oraz małych interferujących RNA (siRNA), nazwanego „interferencją RNA”, stało się przełomowym odkryciem końca ubiegłego wieku. Badacze, którzy zdefiniowali i opisali zjawisko interferencji RNA, A. Z. Fire i C. C. Mello, zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii, w 2006 roku. W procesie biogenezy krótkich regulatorowych RNA istotną rolę odgrywa rybonukleaza Dicer. Rybonukleazy Dicer to białka wielodomenowe, posiadające zazwyczaj: N-kończącą domenę helikazową, domenę o nieznannej funkcji – DUF283 (ang. *domain of unknown function 283*), domeny: Platformy i PAZ, dwie domeny RNazowe (RIIIa i RIIIb) oraz C-kończącą domenę wiążącą dwuniciowy RNA (dsRBD). Niniejszy projekt poświęcony jest domenie helikazowej Dicer człowieka (hDicer). Domena ta odpowiada za rozpoznawanie prekursorów cząsteczek miRNA i siRNA, odpowiednio: pre-miRNA i pre-siRNA. Ponadto, helikaza stanowi platformę umożliwiającą wiązanie różnych partnerów białkowych hDicer. Wiadomo również, że domena helikazowa hDicer zawiera motyw DExD/H-box, który jest odpowiedzialny za wiązanie i hydrolizę ATP. Jednakże, jak dotąd, nie potwierdzono zależności aktywności hDicer od ATP. Co ciekawe, niedawno opublikowane dane wskazują, iż helikaza hDicer może pełnić ważną rolę w obronie przeciwwirusowej.

Badania prowadzone w ostatnich latach znacząco wzbogaciły wiedzę dotyczącą funkcji pełnionych przez rybonukleazy Dicer. Przykładowo, wykazano, że Dicer jest zaangażowana w metabolizm zróżnicowanej puli RNA, m.in. tRNA i snoRNA, usuwanie toksycznych dla komórek dwuniciowych RNA oraz utrzymywanie stabilności genomu. Co ważne, wykazano, że *in vivo* Dicer wiąże się do specyficznych miejsc w obrębie transkryptów w sposób „pasywny”, czyli bez przeprowadzania cięcia RNA. Takie miejsca wiązania Dicer w obrębie transkryptów nazwano „miejscami pasywnymi”. Uważa się, że miejsca pasywne funkcjonują jako system kontrolujący aktywność rybonukleazową Dicer poprzez sekwestrację enzymu i uniemożliwienie jego oddziaływania z pre-miRNA. Ponadto, sugeruje się, że pasywne wiązanie komórkowych transkryptów przez Dicer może stanowić istotny element szlaków komórkowych związanych z regulacją metabolizmu RNA. Przepuszczalnie pasywne wiązanie RNA zachodzi za pośrednictwem domeny helikazowej hDicer.

Rola domeny helikazowej hDicer w obronie przeciwwirusowej komórek ludzkich pozostaje przedmiotem intensywnych dyskusji. Intensywnie badana jest również komórkowa sieć oddziaływań pomiędzy białkami i domeną helikazową hDicer, jednakże sieć powiązań komórkowych RNA i domeny helikazowej hDicer wciąż jest słabo poznana. **W świetle powyższych informacji i założeń, w ramach realizacji niniejszego projektu chcielibyśmy przyjrzeć się sieci komórkowych interakcji pomiędzy domeną helikazową hDicer a RNA.**

W naszych badaniach wykorzystamy ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK 293T) i ich pochodne produkujące: (i) hDicer, (ii) hDicer pozbawioną domeny helikazowej, (iii) hDicer z mutacją w motywie odpowiadającym za hydrolizę ATP w domenie helikazowej. Stosując metodę immunoprecypitacji kompleksów RNA-białko, nakierowaną na C-końcowe domeny hDicer, a następnie sekwencjonowanie nowej generacji pul RNA wiązanych *in vivo* przez hDicer, będziemy wnioskować o **potencjalnym znaczeniu biologicznym interakcji domeny helikazowej hDicer z poszczególnymi transkryptami, a także roli ATP dla tych oddziaływań.**

Ponadto, chcielibyśmy przeprowadzić szczegółową charakterystykę biochemiczną aktywności domeny helikazowej hDicer. W tym celu wykorzystamy szereg cząsteczek RNA o różnej długości i strukturze drugorzędowej. Oddziaływania RNA-białko będą badane z wykorzystaniem metod: (i) opóźnionej migracji w żelu (ang. *electrophoretic mobility shift assays*, EMSA) oraz (ii) interferometrii warstwowej (BLI). Ponadto, zbadamy, czy helikaza hDicer prezentuje aktywność opiekuńczą względem kwasów nukleinowych (ang. *annealing activity*) oraz zdolność do rozplatania dupleksów RNA. Każda z tych aktywności zostanie zbadana pod kątem zależności od ATP.

Jesteśmy przekonani, że poznanie nowych mechanizmów molekularnych stojących za aktywnością Dicer niepowiązaną z procesem biogenezy małych regulatorowych RNA przyczyni się do lepszego zrozumienia licznych zjawisk i procesów zachodzących w komórkach. Dane dotyczące oddziaływań między helikazą hDicer i komórkowymi RNA mogą być ważne dla szerokiego grona badaczy zajmujących się problemem zaburzonej regulacji procesów komórkowych, która może być przyczyną pojawiania się wielu chorób, w tym chorób o podłożu nowotworowym. Biorąc pod uwagę udokumentowane znaczenie domeny helikazowej hDicer w obronie przeciwwirusowej, uzyskane wyniki mogą również przyczynić się do lepszego zrozumienia chorób wywoływanych przez wirusy i roli hDicer w interakcjach między gospodarzem a wirusem.