

Celem niniejszego projektu jest wyjaśnienie przebiegu jednego ze słabiej opisanych etapów biogenezy mikroRNA (miRNA) u roślin – procesu rozplatania dwuniciowego dupleksu miRNA/miRNA\* oraz formowania kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (RISC).

MiRNA to krótkie, zwykle 19-24 nukleotydowe cząsteczki RNA, które regulują powstawanie białek na etapie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Geny kodujące miRNA transkrybowane są przez RNA polimerazę II. W wyniku jej działania powstaje pierwotny transkrypt (pri-miRNA), który zawiera strukturę spinki do włosów. To właśnie w jej trzonie znajduje się dupleks miRNA/miRNA\*, który wycinany jest z pri-miRNA w dwóch reakcjach cięcia przez enzym DICER LIKE1 (DCL1). Uwolniony dupleks jest metylowany, by zapobiec degradacji cząsteczki. Przez lata sądzono, że metylowany dupleks miRNA/miRNA\* jest następnie transportowany przez białko HASTY z jądra do cytoplazmy. Tam jedna z nici dupleksu zostaje załadowana na białko ARGONAUTE1 (AGO1), które stanowi rdzeń kompleksu RISC. Najnowsze doniesienia pokazują jednak występowanie alternatywnego szlaku transportu dupleksu oraz formowania RISC. AGO1 jest bowiem zdolne do przemieszczania się do jądra komórkowego, gdzie jedna z nici dupleksu zostaje na to białko załadowana. Następnie obie cząsteczki opuszczają jądro w formie kompleksu AGO1:miRNA. Chociaż doniesienia te rzuciły nowe światło na proces formowania kompleksu RISC, mechanizm ładowania miRNA na AGO1 nadal pozostaje niejasny. **W niniejszym projekcie proponujemy model, w którym helikaza DRH1 rozplata dupleks miRNA/miRNA\*, pomagając w ładowaniu dojrzałej cząsteczki miRNA na AGO1, oraz ułatwia eksport kompleksu AGO1:miRNA do cytoplazmy.** Helikaza DRH1 należy do rodziny DEAD-box. Rodzina ta swoją nazwę zawdzięcza wysoce konserwatywnej sekwencji czterech aminokwasów w motywie II białek, których jednoliterowe oznaczenia tworzą skrót DEAD. DRH1 jest zaangażowane w biogenezę rRNA, eksport mRNA oraz kontrolę jakości mRNA, zwaną NMD (ang. Nonsense-Mediated-Decay). Nasze wyniki wstępne wykazały występowanie bezpośredniej interakcji pomiędzy DRH1 i AGO1, pozwalając wysnuć hipotezę o udziale helikazy w formowaniu kompleksu RISC. Eksperymenty zaplanowane w niniejszym projekcie mają na celu weryfikację tego założenia.

W ramach niniejszego projektu zamierzamy sprawdzić zaangażowanie helikazy DRH1 w rozplatanie dupleksu miRNA/miRNA\* oraz eksport kompleksu AGO1:miRNA do cytoplazmy. Po pierwsze planujemy zbadać rozkład dojrzałych cząsteczek miRNA oraz miRNA\* w jądrze i cytoplazmie za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania małych RNA (sRNA). Eksperyment ten pozwoli nam zbadać udział DRH1 w transporcie miRNA. Ponadto, planujemy sprawdzić lokalizację komórkową białka AGO1 w mutancie helikazowym za pomocą immunolokalizacji i Western blot. Zastosowane podejście umożliwi nam określenie funkcji helikazy w transporcie kompleksu AGO1:miRNA z jądra do cytoplazmy. Ponadto, aby zbadać rolę DRH1 w rozplataniu dupleksów zamierzamy przeprowadzić sekwencjonowanie sRNA związanych z AGO1 z dwóch przedziałów komórkowych (jądra i cytoplazmy) w mutancie helikazowym. Dodatkowo, udział DRH1 w rozplataniu dupleksów oraz formowaniu RISC planujemy sprawdzić za pomocą różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA).

Realizacja niniejszego projektu pozwoli na poszerzenie naszej wiedzy o jednym z podstawowych procesów zachodzących w komórkach eukariontów. Ponadto, zebrane dane umożliwią charakterystykę mechanizmu działania słabo opisanego helikazy DRH1.