

Endorybonukleaza Dicer jest znana głównie ze swojej ważnej roli w procesie biogenezy małych regulatorowych RNA. Podczas tego procesu, Dicer wycina krótkie duplekisy RNA zawierające funkcjonalne mikroRNA (miRNA) lub małe interferujące RNA (siRNA) z odpowiednio: jednoniciowych prekursorów przyjmujących strukturę typu spinki (pre-miRNA) lub z dwuniciowych RNA (dsRNA). Częsteczki miRNA lub siRNA, wraz z białkami Argonaute, tworzą kompleks wyciszający indukowany przez RNA (RISC), który bierze udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów. W ostatnim czasie pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych opisujących inne, niekanoniczne funkcje białek Dicer związane zarówno z ich występowaniem w cytoplazmie, jak i na terenie jądra komórkowego. Przykładowo, wykazano, iż u nicienia *Caenorhabditis elegans* kaspazy aktywowane podczas procesu apoptozy przecinają Dicer, generując skróconą formę białka, która przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego i pełni funkcję deoksyrybonukleazy inicjującej proces fragmentacji chromosomalnego DNA. Znane są również funkcje Dicer niepowiązane z aktywnością nukleazową; przykładowo, stwierdzono, iż u nicieni oraz w komórkach ludzkich, Dicer wiąże różne typy RNA w sposób „pasywny”, czyli bez przeprowadzania cięcia. Nasze najnowsze badania ujawniły, że w warunkach *in vitro* hDicer może również wiązać RNA i DNA przyjmujące struktury G-kwadrupeksów, w wyniku czego zahamowany zostaje proces cięcia kanonicznych substratów hDicer. Stosując techniki oparte na immunoprecypitacji, zidentyfikowaliśmy w ludzkich komórkach wiele transkryptów zawierających sekwencje bogate w reszty guaninowe, przyjmujące struktury G-kwadrupeksu w regionie wiązonym przez hDicer.

G-kwadrupeksy pełnią ważną rolę regulacyjną w podstawowych procesach biologicznych, takich jak replikacja, transkrypcja czy translacja, podczas gdy nieprawidłowe tworzenie tych struktur jest związane z niestabilnością genomu i powstawaniem nowotworów. Zrozumienie funkcji biologicznych odgrywanych przez G-kwadrupeksy wymaga szczegółowej wiedzy na temat komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy białkami i cząsteczkami przyjmującymi struktury G-kwadrupeksów. Nasze najnowsze odkrycie wskazujące, że hDicer może wiązać G-kwadrupeksy RNA i DNA otwiera nowe możliwości badań nad funkcjami komórkowymi Dicer. W świetle tych badań, a także biorąc pod uwagę istotną rolę G-kwadrupeksów w regulacji kluczowych szlaków komórkowych, pojawiają się nowe wyzwania i szereg pytań, na które chcielibyśmy odpowiedzieć podczas realizacji niniejszego projektu. Jedno z pytań brzmi: **jakie może być znaczenie biologiczne oddziaływań *in vivo* pomiędzy ludzką rybonukleazą Dicer i cząsteczkami RNA przyjmującymi struktury G-kwadrupeksów?**

Ponadto, biorąc pod uwagę doniesienia opisujące oddziaływanie Dicer z chromatyną, a także fakt, iż w warunkach *in vitro* hDicer łączy się z telomerowym DNA, zakładamy, że w warunkach *in vivo* rybonukleaza ta może także wiązać DNA przyjmujący struktury G-kwadrupeksowe. Obecnie wiadomo, że hDicer jest celem dla apoptotycznych kaspaz. Jednakże, w przeciwieństwie do Dicer nicienia *C. elegans*, jak dotąd nie opisano migracji apoptotycznie skróconej formy ludzkiej Dicer z cytoplazmy do jądra. Zadajemy sobie zatem pytania: **Czy ludzka Dicer, podobnie jak Dicer nicienia *C. elegans*, w wyniku indukcji apoptozy może przemieszczać się z cytoplazmy do jądra komórkowego? Czy jądrowa hDicer może łączyć się z telomerowym DNA oraz innymi G-kwadrupeksami powstającymi w obrębie chromatyny? Jakie jest potencjalne znaczenie biologiczne tych oddziaływań?**

W celu potwierdzenia oddziaływań pomiędzy hDicer i G-kwadrupeksami w komórce, zastosujemy badania bazujące na mechanizmie FRET (ang. Förster Resonance Energy Transfer). Badania te opierają się na założeniu, iż „chromofor-donor” (dołączony do hDicer), będąc w stanie wzbudzone, może przekazywać energię wzbudzenia „chromoforowi-akceptorowi” (dołączonemu do G-kwadrupeksu) znajdującemu się w odległości nie większej niż ok. 10 nm. Co więcej, planujemy przeprowadzić obrazowanie kolokalizacji hDicer i G-kwadrupeksów z wykorzystaniem nanoskopii MINFLUX - pionierskiej technologii, która umożliwia nie tylko identyfikację oddziaływań i odległości między dwoma cząsteczkami w komórce, ale także pozwala na jednoznaczną weryfikację, czy obie cząsteczki znajdują się obok siebie i czy rzeczywiście wchodzi w interakcję. Biorąc pod uwagę jądrowo-cytoplazmatyczną lokalizację białek Dicer oraz fakt, że w warunkach *in vitro* hDicer wiąże się z ludzkim telomerowym DNA, chcielibyśmy **zidentyfikować i scharakteryzować pulę DNA wiązanych przez hDicer w komórkach ludzkich. W tym celu zastosujemy metodę immunoprecypitacji chromatyny powiązaną z głębokim sekwencjonowaniem „wyłowionych” fragmentów DNA wiązanych przez hDicer (ChIP-seq). **Na podstawie zebranych danych będziemy wnioskować o potencjalnym znaczeniu biologicznym oddziaływań hDicer z G-kwadrupeksami RNA/DNA.****

Wiedza zdobyta podczas realizacji niniejszego projektu poszerzy nasze zrozumienie molekularnych mechanizmów kryjących się za aktywnością Dicer niepowiązaną z procesem biogenezy małych regulatorowych RNA. Z uwagi na fakt, iż struktury G-kwadrupeksów często występują w genomach i transkryptomach oraz pełnią ważną rolę regulatorową, **identyfikacja białek oddziałujących z G-kwadrupeksami jest niezbędna do poznania funkcji pełnionych przez te niekanoniczne struktury.** Ponadto, dane dotyczące interakcji *in vivo* między ludzką Dicer a G-kwadrupeksami RNA/DNA mogą dostarczyć cennych informacji na temat komórkowej puli G-kwadrupeksów regulowanych za pośrednictwem tego białka. Wyniki te mogą mieć ważne znaczenie dla szerokiego grona badaczy skupiających się na problemie zaburzonej regulacji procesów komórkowych wynikającej z nieprawidłowego tworzenia się G-kwadrupeksów; na przykład niestabilności genomu, która może być przyczyną pojawiania się wielu chorób, w tym chorób o podłożu nowotworowym.