

Złożona natura białek wielodomenowych: na tropie aktywności ludzkiej rybonukleazy Dicer

Białka wielodomenowe mogą potencjalnie pełnić wiele funkcji w komórce. Przypuszczalnie, białka wielodomenowe wyewoluowały w wyniku fuzji dwóch lub więcej domen tworzących pierwotne białka jednodomenowe lub pojawiły się w wyniku zdarzeń takich jak duplikacja, czy też rekombinacja domen białkowych. Nowe kombinacje poszczególnych domen mają ogromne znaczenie w ewolucji białek, ponieważ mogą zapewniać bezpośrednie połączenia między białkami, które działają w sposób skoordynowany; na przykład pomiędzy kolejnymi enzymami tego samego szlaku komórkowego. Co ważne, taka konsolidacja domen białkowych pozwala na oszczędność czasu i energii komórki. Doskonałym przykładem białek wielodomenowych są rybonukleazy Dicer. Rybonukleazy Dicer są powszechnie znane ze swojej ważnej roli w procesie biogenezy małych regulatorowych RNA: mikroRNA (miRNA) i małych interferujących RNA (siRNA). Wadliwe formy Dicer inicjują procesy patologiczne, w tym kancerogenezę, a także choroby neurodegeneracyjne, układu odpornościowego i reumatyczne. Białka Dicer należą do rodziny rybonukleaz III (RNaz III), enzymów, które specyficznie tną dwuniciowe cząsteczki RNA (dsRNA). Typowa rybonukleaza Dicer składa się z domeny helikazowej, domeny o nieznanym celu (DUF283), Platformy, domeny PAZ, dwóch domen RNazy III i domeny wiążącej dsRNA; jednakże budowa domenowa białek Dicer różni się w zależności od gatunku. Rybonukleaza Dicer i jej homologi rozwinęły się tylko u eukariontów; niemniej jednak dwie domeny enzymatyczne Dicer, helikaza i RNaza III, wykazują duże podobieństwo sekwencji do swoich prokariotycznych ortologów. Badania ewolucyjne wskazują, że połączenie domen helikazy i RNazy III w pojedynczym białku jest sygnaturą eukariotyczną i przypuszczalnie jednym z krytycznych zdarzeń, które doprowadziło do konsolidacji elementów szlaków komórkowych związanych z wyciszaniem ekspresji genów przez miRNA/siRNA (interferencja RNA); cząsteczki miRNA i siRNA generowane przez białka Dicer są kluczowymi elementami wspomnianych szlaków. Aktywność enzymatyczna domen RNazowych białek Dicer jest dobrze znana; przeprowadzają one hydrolizę substratu. Niemniej jednak aktywność enzymatyczna domeny helikazowej Dicer kręgowców jest nadal niejasna. W niniejszym projekcie skupimy się na domenie helikazowej ludzkiej Dicer (hDicer). Domena helikazowa hDicer posiada konserwatywne motywy ATPazy; jednakże sugeruje się, że przodkowie Dicer, z linii hDicer, mieli zmniejszone powinowactwo do wiązania ATP, w wyniku czego utracili zdolność do hydrolizy ATP, w przeciwieństwie do roślinnych, czy też owadzych białek typu Dicer. Pozostaje zatem zagadką, dlaczego hDicer zachowała konserwatywne motywy ATPazowe? Co ciekawe, wyniki naszych najnowszych badań wskazują, że domena helikazowa hDicer jest zdolna do hydrolizy ATP. O ile nam wiadomo, jest to pierwszy przypadek odnotowania tego typu aktywności u Dicer kręgowców. W świetle tych badań, pojawiają się nowe wyzwania i szereg pytań, na które chcielibyśmy odpowiedzieć podczas realizacji niniejszego projektu. Jedno z pytań brzmi: jakim celem, szlakiem molekularnym i komórkowym, może służyć funkcja ATPazowa hDicer? Aby odpowiedzieć na to pytanie, wykorzystując techniki spektrometrii masowej, planujemy zidentyfikować białka oddziałujące z domeną helikazową hDicer i w konsekwencji wytypować potencjalne szlaki molekularne i komórkowe, które mogą być powiązane z aktywnością ATPazową hDicer.

W naszych badaniach *in vitro* obserwowaliśmy aktywność ATPazową hDicer tylko przy niskich stężeniach substratu. Przypuszczamy, że po pierwszej rundzie hydrolizy ATP, produkty hydrolizy pozostają związane z domeną helikazową hDicer, blokując kolejną rundę reakcji. *In vivo*, uwalnianie produktu może być stymulowane przez nieznaną obecnie czynnik, lub czynniki, nieobecne w naszych reakcjach *in vitro*. Aktywność ATPazowa niektórych białek chaperonowych może być regulowana poprzez kontakty międzydomenowe. Można zatem przypuszczać, że interakcje między domenami hDicer i domenami białek oddziałujących z hDicer mogą również wpływać na aktywność ATPazową hDicer. Co ciekawe, wykazano, że RNA może stymulować aktywność ATPazową Dicer niektórych bezkręgowców poprzez zwiększenie ich powinowactwa do ATP. Co ważne, stwierdzono, że hDicer wiąże różne komórkowe RNA, w tym mRNA i długie niekodujące RNA, w sposób „pasywny”, czyli bez przeprowadzania cięcia. Pasywne wiązanie hDicer z transkryptami odbywa się przypuszczalnie za pośrednictwem domeny helikazowej. Biorąc pod uwagę przedstawione fakty i hipotezy, w celu lepszego poznania aktywności ATPazowej domeny helikazowej hDicer, chcielibyśmy ustalić, które z czynników: białka partnerujące hDicer, RNA, czy też oba te czynniki, mogą wpierać hydrolizę ATP przez hDicer. W celu odpowiedzi na powyższe pytania, wykorzystując zaawansowane techniki obrazowania mikroskopowego, zweryfikujemy interakcje między hDicer a wybranymi białkami partnerskimi i wybranymi RNA. W badaniach *in vitro* określimy, czy konkretne białka lub RNA mogą wspierać, czy też blokować hydrolizę ATP przez hDicer. Ponadto, aby lepiej zrozumieć charakter oddziaływań pomiędzy poszczególnymi domenami hDicer a wytypowanymi czynnikami wpływającymi na hydrolizę ATP, zastosujemy technikę kriomikroskopii elektronowej.

Wyniki zgromadzone podczas realizacji niniejszego projektu dostarczą nowych, cennych informacji na temat szlaków molekularnych i komórkowych regulowanych przez hDicer. Biorąc pod uwagę złożoną naturę białek wielodomenowych, nie jest zaskoczeniem, że dysfunkcja Dicer jest powiązana z wieloma skomplikowanymi chorobami, w tym chorobami nowotworowymi, neurodegeneracyjnymi, układu odpornościowego i reumatoidalnymi. Nowa wiedza na temat szlaków komórkowych powiązanych z aktywnością białek Dicer może poszerzyć naszą wiedzę na temat etiologii wielu chorób, w tym tych wymienionych powyżej.