

Analiza strukturalnych uwarunkowań wybranych etapów biogenezy małych regulatorowych RNA u *Arabidopsis thaliana*

Agnieszka Mickiewicz-Piotrowska

Streszczenie

Regulacja ekspresji genów jest dla roślin procesem dzięki któremu mogą bronić się przed egzogennymi patogenami, sterować procesami rozwojowymi, jak i reagować na zmieniające się warunki środowiska. Małe regulatorowe RNA, będące elementami szlaku potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, to precyzyjny i szybki sposób na obniżenie poziomu ekspresji genów, co sprawia, że stanowią potencjalne narzędzie do badań biologii molekularnej a także celów aplikacyjnych na roślinach uprawnych.

Biogeneza małych regulatorowych RNA rozpoczyna się od długich RNA posiadających w swojej strukturze fragmenty dwuniciowe. Jedno z białek DCL wycina z nich dupleksy o długości 20-24 nt, które zostają następnie rozplecione w kompleksie Mikroprocesora, gdzie nicią wiodącą pozostaje od niego przyłączona jako wzorzec do rozpoznania mRNA. W kolejnym etapie kompleks ten przyłącza się do mRNA i przecina je w miejscu hybrydyzacji srRNA. Każde z roślinnych białek DCL wycina fragmenty o charakterystycznej dla siebie, stałej długości, jednakże dotąd nie określono eksperymentalnie struktury żadnego z nich. Struktura dupleksu miRNA:miRNA* oraz oddziaływanie pomiędzy nicią wiodącą miRNA, a miejscem docelowym w mRNA wydaje się mieć istotny wpływ na efektywność potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, jednakże nie są znane dokładne parametry strukturalne srRNA warunkujące skuteczność ich działania. W ramach niniejszej rozprawy zrealizowano następujące cele badawcze w kierunku poznania strukturalnych uwarunkowań biogenezy roślinnych srRNA:

1. Wyznaczono szereg cech, zarówno na poziomie sekwencji jak i struktury drugorzędowej dsRNA. Badano dwa zestawy danych: jeden obejmował dupleksy miRNA:target, zaś drugi prekursorów miRNA, z których, już po uzyskaniu struktury drugorzędowej, pobierane do dalszej analizy były dupleksy miRNA:miRNA* przedłużone o 10 nt przed i za sekwencją miRNA. W ten sposób uzyskano referencyjne profile

termodynamiczne, wykorzystane później jako parametr do weryfikacji potencjalnych amiRNA.

2. Opracowano nowy algorytm wykorzystujący cechy termodynamiczne naturalnych struktur, które tworzą miRNA w swoich prekursorach, jak i oddziałujące z docelowym transkryptem wycisanego genu. Stworzono narzędzie bioinformatyczne AmiRNA Designer umożliwiające projektowanie sekwencji wyciszających zadany gen. Wykorzystano opracowany program do generowania sekwencji sztucznych miRNA (amiRNA) dla przykładowych genów. Po zaprojektowaniu każdej sekwencji program sprawdza jej zgodność z parametrami profili termodynamicznych. Opracowano sposób wprowadzania modyfikacji do sekwencji srRNA, tak by szczegóły termodynamiczne dupleksów tworzonych przez projektowane sekwencje lepiej pasowały do profili. Przebiega to wg. następującego planu:

1. Uzyskanie sekwencji komplementarnej do zadanego TARGETu=>amiRNA
2. Porównanie szczegółów termodynamicznych dupleksu TARGET:amiRNA z profilem termodynamicznym dupleksu target:miRNA
3. Modyfikacje sekwencji amiRNA, ponowne porównanie j.w.
4. Uzyskanie ostatecznej sekwencji amiRNA
5. Uzyskanie sekwencji komplementarnej do amiRNA=>amiRNA*
6. Porównanie szczegółów termodynamicznych dupleksu amiRNA:amiRNA* z profilem termodynamicznym dupleksu miRNA:miRNA*
7. Modyfikacje sekwencji amiRNA*, ponowne porównanie j.w.
8. Uzyskanie ostatecznej sekwencji amiRNA*

3. Wymodelowano strukturę przestrzenną białka AtDCL4 w kompleksie z jego substratem dsRNA, określając związek pomiędzy strukturą enzymu a długością wycinanych przez niego fragmentów dsRNA. Stosując metody *in silico* zidentyfikowano białkowe czynniki strukturalne – miejsca katalityczne wiążące RNA oraz istotne zwoje, domeny i poszczególne reszty aminokwasowe – oddziałujące z dsRNA i mające bezpośredni wpływ na powstawanie srRNA. W szczególności wykorzystano modelowanie porównawcze (w oparciu o homologie) oraz modelowanie kompleksu białko-RNA, metodę analizy drgań normalnych i symulacje dynamiki molekularnej kompleksów białek z RNA. Modelowanie struktury białka w oparciu o skromne dane – niewiele poznanych struktur oraz ich niskie podobieństwo sekwencyjne do

modelowanego białka – okazało się zadaniem nietrywialnym. Zarówno fragmenty sekwencji nieposiadające żadnego odpowiednika mogącego stanowić szablon strukturalny, jak i te z nikłym podobieństwem do znanych struktur wymagały większej uwagi i dodatkowych zabiegów. Otrzymane modele zostały poddane szeregowi analiz komputerowych określających ich wiarygodność jako wysoką, a także analizie porównawczej łączącej poziomy sekwencji, struktury oraz danych pochodzących z eksperymentów biochemicznych.

W efekcie realizacji celów niniejszej pracy doktorskiej powstało pięć publikacji, przeglądowych, jak i opisujących wyniki badań własnych a także program komputerowy AmiRNA Designer, który ma na celu projektowanie sekwencji wyciszających, skierowanych specyficznie do określonego genu, w szczególności roślinnego.