

mgr Kinga Ciechanowska

Zakład Biochemii Rybonukleoprotein

promotor: dr hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak, prof. IChB PAN

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Nowe spojrzenie na domenę helikazową ludzkiej rybonukleazy Dicer i jej aktywności biochemiczne, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności wiązania RNA

STRESZCZENIE

Rybonukleazy Dicer kojarzone są głównie z ich ważnej roli w biogenezie mikroRNA (miRNA) oraz małych interferujących RNA (siRNA). Substratami Dicer w tym procesie są odpowiednio: prekursor miRNA (pre-miRNA) oraz długie dwuniciowe RNA (dsRNA). Jednakże białka te mogą uczestniczyć także w wielu innych procesach, przykładowo, w remodelowaniu struktury chromatyny, degradacji chromosomalnego DNA podczas apoptozy, czy procesie naprawy uszkodzeń DNA. Zaangażowanie Dicer w tak różne procesy wskazuje, że rybonukleaza ta może oddziaływać z różnymi rodzajami kwasów nukleinowych, zarówno RNA, jak i DNA. Większość enzymów Dicer to wielodomenowe białka zbudowane, począwszy od końca aminowego, z domeny helikazowej, domeny DUF283 (ang. *domain of unknown function*), domeny PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), dwóch domen RNazy III (RNaza IIIa i RNaza IIIb) oraz domeny wiążącej dwuniciowy RNA. Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej skupiają się na domenie helikazowej ludzkiej rybonukleazy Dicer (hDicer).

Obecnie wiadomo, że domena helikazowa hDicer odpowiada za odróżnianie substratów pre-miRNA od dsRNA, przypuszczalnie poprzez oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA. Warianty delecyjne hDicer pozbawione domeny helikazowej, w porównaniu do kompletnej hDicer, wydajniej wiążą długie dsRNA i wydajniej tną je na fragmenty o długości ok. 22 par zasad. Bez wątplenia interesującym aspektem jest udział hDicer w „pasywnym” wiązaniu komórkowych RNA, czyli wiązaniu, któremu nie towarzyszy proces cięcia substratu. Przypuszczalnie kluczową rolę w pasywnym wiązaniu komórkowych RNA odgrywa domena helikazowa hDicer. Szczegółowa charakterystyka aktywności biochemicznych, w tym specyficzności substratowej, domeny helikazowej hDicer nie została jednak przeprowadzona. Celem badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej było poszerzenie stanu wiedzy na temat domeny helikazowej hDicer, w szczególności określenie jakie aktywności biochemiczne prezentuje domena helikazowa

hDicer oraz jakiego rodzaju kwasy nukleinowe mogą stanowić substraty dla domeny helikazowej hDicer, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in cellulo*.

W badaniach *in vitro* wykorzystano preparat domeny helikazowej hDicer (HEL hDicer) wyprodukowany w bakteriiach *E. coli* typu BL21 (DE). Otrzymany preparat prezentował aktywność wiązania i hydrolizy ATP. Na uwagę zasługuje fakt, że po raz pierwszy udało się pokazać, że hDicer również potrafi hydrolizować ATP. Wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej nie wykazywał aktywności ATPazowej, co wspiera przypuszczenia, że domeną odpowiedzialną za wiązanie i hydrolizę ATP w hDicer jest domena helikazowa. Następnie, wykorzystując metodę spowolnionej migracji w żelach poliakrylamidowych (EMSA) oraz interferometrię biowarstwową (BLI), pokazano, że HEL hDicer wiąże jednoniciowe RNA i DNA o długości powyżej 20 nukleotydów, nie wiąże natomiast dsRNA i dsDNA. Wiązanie kwasów nukleinowych przez HEL hDicer odbywało się w sposób niezależny od ATP. Co ciekawe, zauważono, iż HEL hDicer może indukować zmiany strukturalne w obrębie cząsteczek RNA, również w sposób niezależny od ATP. W dalszej kolejności pokazano, że HEL hDicer nie wykazuje aktywności helikazowej wobec dsRNA oraz dsDNA, pomimo obecności motywu DExD/H-box, który znany jest z aktywności rozplatania dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych. HEL hDicer nie prezentował także aktywności wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid annealing activity*).

Chcąc zgłębić rolę domeny helikazowej w wiązaniu komórkowych RNA przez hDicer, wykorzystano metodę irCLIP-seq (ang. *Infrared Crosslinking Immunoprecipitation followed by NGS sequencing*), która umożliwia „wyławianie” specyficznych kompleksów RNA•białko powstających w żywych komórkach i identyfikację związanych z białkiem RNA. W badaniach użyto: (i) komórki HEK 293T 4-25 NoDice (bez endogennej hDicer) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej (hDicer_ΔHEL) oraz jako kontrole (ii) komórki 4-25 NoDice transfekowane wektorem z sekwencją kodującą WT hDicer (tzw. „rescue control”) i (iii) komórki HEK 293T z endogenną WT hDicer (linia typu dzikiego). Wstępne analizy porównawcze wykazały, iż hDicer_ΔHEL oddziałuje z inną pulą cząsteczek RNA, czy też innymi fragmentami tożsamych RNA, niż WT hDicer. Wyniki wstępnych analiz sugerują, że domena helikazowa hDicer bierze udział nie tylko w rozróżnianiu substratów pre-miRNA od dsRNA, lecz może mieć także ważne znaczenie przy wyborze i wiązaniu innego typu cząsteczek RNA występujących w komórkach.

Poznanie komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy RNA i hDicer pozwoli na poszerzenie wiedzy na temat funkcji hDicer wykraczających poza ścieżki biogenezy miRNA i siRNA. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zainteresowanie szerokiego grona badaczy zajmujących się problematyką nieprawidłowej regulacji procesów komórkowych prowadzących do rozwoju wielu chorób, w tym także chorób nowotworowych. Zważając na 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 oddziaływaniach wirus-gospodarz.