

Potencjalna aktywność DNazowa oraz możliwe funkcje biologiczne wybranych wariantów delecyjnych ludzkiej rybonukleazy Dicer

Streszczenie

Kluczową rolę w biogenezie krótkich regulatorowych RNA (srRNA) odgrywa rybonukleaza Dicer, która wycina dupлексы mikroRNA (miRNA) oraz małe interferujące RNA (siRNA), z odpowiednio: jednoniciowych prekursorów miRNA przyjmujących strukturę spinki (pre-miRNA) oraz z długich dwuniciowych RNA (dsRNA), tzw. pre-siRNA. Generowane przez Dicer srRNA biorą udział w procesie regulacji ekspresji genów. Przedstawiona rozprawa doktorska skupia się na ludzkiej rybonukleazie Dicer (hDicer). hDicer jest białkiem wielodomenowym, zbudowanym z następujących po sobie domen: N-końcowej domeny helikazowej, domeny DUF283, domeny Platformy, PAZ oraz helisy łączącej, dwóch domen RNazy III (RNaza IIIa i IIIb) oraz C-końcowej domeny wiążącej dwuniciowy RNA (dsRBD). Istotną rolę w wiązaniu substratów pre-miRNA oraz pre-siRNA odgrywają domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej (tzw. kasetę PPC). Odległość pomiędzy kasetą PPC a domenami RNazowymi determinuje długość generowanych produktów; w przypadku hDicer długość generowanych srRNA wynosi ~22 nukleotydy (nt).

Obecność wszystkich domen hDicer jest kluczowa dla wydajnego i precyzyjnego cięcia substratów pre-miRNA, a tym samym, generowania miRNA o określonej długości. Dane literaturowe wskazują, że białka oddziałujące z Dicer, przypuszczalnie poprzez wpływ na aranżację jej domen, mogą wpływać na długość produktów generowanych przez tę rybonukleazę. Co ciekawe, znane są warianty rybonukleaz Dicer pozbawione niektórych z domen, tzw. „skrócone formy” („skrócone warianty”) Dicer. Skrócone formy Dicer mogą powstawać, między innymi, w rezultacie procesu alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu kodującego Dicer, bądź w wyniku aktywności hydrolitycznej proteaz komórkowych. Aktywności skróconych form Dicer różnią się od aktywności białek „pełnej długości”. Przykładowo, wariant Dicer pozbawiony domeny helikazowej preferencyjnie wiąże substraty pre-siRNA. Wykazano także, iż u nicienia *Caenorhabditis elegans* aktywowane podczas procesu apoptozy kaspazy przecinają Dicer, generując skróconą formę białka (tDCR-1), która pełni funkcję deoksyrybonukleazy (DNazy) inicjującej proces fragmentacji chromosomalnego DNA.

Pierwszym celem przedłożonej rozprawy doktorskiej było zbadanie, czy hDicer, podobnie jak Dicer *C. elegans*, posiada potencjał do hydrolizy substratów DNA. W wybranych do badań komórkach ludzkich, w których wywoływany był proces apoptozy, nie udało się zidentyfikować skróconej formy hDicer podobnej do tDCR-1 *C. elegans*. W celu odpowiedzi na pytanie, czy hDicer, podobnie jak Dicer pochodząca z *C. elegans*, może prezentować aktywność DNazową, z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej otrzymano szereg skróconych form hDicer, w tym wariant odwzorowujący tDCR-1 *C. elegans*. Wariant hDicer odwzorowujący skróconą formę Dicer *C. elegans* nie wykazywał aktywności DNazowej. Zgromadzone dane ujawniły jednak, że warianty hDicer pozbawione domeny DUF283 oraz warianty nieposiadające domeny PAZ lub całej kasy PPC prezentują aktywność DNazową. Uzyskane wyniki wykazały, iż hDicer posiada potencjał do hydrolizy zarówno jedno-, jak i dwuniciowych DNA.

Drugi nurt badawczy poświęcony był analizie wariantów hDicer powstających w komórkach i próbie zdefiniowania ich funkcji. Analizy transkryptomyczne pozwoliły na zidentyfikowanie szeregu skróconych wariantów transkrypcyjnych genu *DICER1*. Wśród nich zidentyfikowano wariant opisany w literaturze jako *Dicer1e*. Wariant ten powstaje w wyniku procesu alternatywnego składania pierwotnego transkryptu genu *DICER1*. Białko *Dicer1e*, w odróżnieniu od hDicer, posiada unikatowy koniec N oraz zaledwie trzy domeny: RNazy IIIa, RNazy IIIb oraz dsRBD. *Dicer1e* ulega ekspresji zarówno w komórkach zdrowych (prawidłowych), jak i zmienionych nowotworowo. Wiadomo, że poziom ekspresji *Dicer1e* jest tkankowo-specyficzny, a w przypadku komórek nowotworowych, zależy także od typu i przypuszczalnie stopnia rozwoju nowotworu. Jak dotąd, nie scharakteryzowano aktywności biochemicznych białka *Dicer1e*. Z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej otrzymano preparat białkowy *Dicer1e*, a następnie zbadano aktywności biochemiczne prezentowane przez ten wariant. Testy aktywności nukleazowej wykazały, że *Dicer1e* nie generuje produktów miRNA, jednakże może on hydrolizować krótkie RNA. Co ciekawe, *Dicer1e* wykazywał aktywność DNazową. W celu zbadania potencjalnej komórkowej funkcji wariantu *Dicer1e*, wykorzystano komórki HEK293T oraz HEK293T No Dice (linia typu *DICER1 knock out*, w której nie powstaje endogenna hDicer), które były transfekowane plazmidem umożliwiającym produkować wariantu *Dicer1e*. Następnie przeprowadzono analizy NGS puli całkowitego RNA izolowanego ze wspomnianych linii komórkowych. Badano także poziom ekspresji wybranych miRNA w użytych w badaniach liniach komórkowych. Zgromadzone

dane sugerują, że wariant Dicer1e może być zaangażowany w metabolizm komórkowych RNA i, co ciekawe, organizację struktury chromatyny.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat udziału białek typu Dicer w procesach komórkowych wykraczających poza ścieżki biogenezy srRNA.