

Piotr Filipczak
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach
Zakład Biologii Nowotworów

Proces interferencji RNA oraz wykorzystanie tego zjawiska w naukach biomedycznych.

Praca współfinansowana jest ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu RFSD2

Tematyka niniejszego projektu poświęcona jest białku HspA2. Należy ono do rodziny białek opiekuńczych HSP (*heat shock proteins*) i ulega silnej oraz specyficznej ekspresji w wielu typach nowotworów. Celem badań jest analiza wpływu ekspresji białka HspA2 na metabolizm komórek nowotworowych, przede wszystkim na ich oporność na czynniki stosowane w terapii klinicznej. W tym celu planowane jest wyciszenie ekspresji genu *HSPA2* w wybranych liniach nowotworowych, w których omawiane białko syntetyzowane jest w dużej ilości (między innymi linie niedrobnokomórkowego raka płuca NCIH1299 oraz A549). Zostanie zastosowana metoda inżynierii genetycznej, która wykorzystuje zjawisko interferencji RNA.

Interferencja RNA to proces potranskrypcyjnego wyciszania genów, charakterystyczny dla organizmów eukariotycznych. Jego istotą jest enzymatyczna degradacja lub zahamowanie translacji specyficznego mRNA mającego ulec wyciszeniu. Dokonuje się to poprzez krótkie cząsteczki dwuniciowych RNA, zwane w zależności od pochodzenia siRNA (*short interfering RNA*) lub miRNA (*mikro RNA*). Po znalezieniu się w cytoplazmie komórki, cząsteczki te są wbudowywane w wieloskładnikowy kompleks enzymatyczny RISC (RNA interference silencing complex) i hydrolizowane do formy jednoniciowej. Następnie łańcuch si/miRNA łączy się z docelowym mRNA w oparciu o komplementarność zasad azotowych i tworzy z nim dwuniciowy fragment. Umożliwia to kompleksowi RISC, w zależności od mechanizmu procesu, przeprowadzenie endonukleolitycznej hydrolizy łańcucha mRNA lub inhibicję jego translacji.

Hamowanie ekspresji genów w oparciu o interferencję RNA jest niezwykle precyzyjne i swoiste dla konkretnej sekwencji nukleotydowej, przez co zjawisko to na szeroką skalę wykorzystuje się obecnie w badaniach z zakresu biologii molekularnej. Stosowanie narzędzi inżynierii genetycznej wykorzystujących omawiany proces pozwala na swoiste wyciszenie ekspresji genów zarówno w układach *in vitro*, jak i *in vivo*. Umożliwia to analizę wpływu zahamowanej syntezy białek kodowanych przez docelowe geny na metabolizm komórek oraz całych organizmów, co jest źródłem cennej wiedzy na temat ich funkcji.

W ramach prezentowanych projektów, realizowanych w Zakładzie Biologii Nowotworów, wykorzystuje się wspomniane techniki w badaniach białek szoku cieplnego. Stosowany jest wektor DNA zawierający gen, którego ekspresja prowadzi do syntezy cząsteczki interferującego RNA. Konstrukty takie uzyskuje się poprzez ligację sekwencji DNA kodującej pożądane mikroRNA z wektorem typu pSIREN skonstruowanym przez firmę Clontech. Obecnie wektory te wykorzystywane są w naszym zakładzie do uzyskiwania ludzkich oraz mysich nowotworowych linii komórkowych ze stabilnym wyciszeniem genów HspA2, HspA1 oraz HSF1.