

Analýza krátkých isoform proteinů Argonaut z myších oocytů

Abstrakt:

Proteiny z rodiny Argonautů, řízené malými molekulami RNA, představují konzervované jádro mechanismů umlčování RNA (RNA silencing). Tyto mechanismy potlačují produkci virů, šíření mobilní DNA, a regulují genovou expresi na základě sekvenční informace nesené asociovanou RNA. V somatických buňkách savců je dominantním mechanismem regulační microRNA (miRNA) dráha. Malé miRNA ovlivňují expresi většiny savčích genů. Argonaute proteiny inhibují translaci a indukují deadenylaci mRNA s částečnou homologií k navázané miRNA. Deadenylace obvykle vyústí degradaci mRNA. Těmito mechanismy miRNA dráha citlivě kontroluje hladiny produkovaných proteinů. Na rozdíl od příbuzného mechanismu RNA interference (RNAi) využívajícího katalyticky aktivní proteiny Argonaute schopné rozštěpit komplementárních molekuly RNA, miRNA umlčování je závislé na celé řadě dalších faktorů. Role miRNA regulace v komplexních biologických procesech od organogeneze, přes krvetvorbu až po rakovinu je dobře doložená. Myší oocyty postrádající kanonické miRNA jsou překvapivě schopné oplození a úspěšně projdou preimplantačním vývojem. Ani nejčtenější oocytární miRNA však nejsou sto efektivně umlčet cílové geny, přestože příbuzný mechanismus RNAi, sdílející s miRNA mechanismem klíčové enzymy, je v oocytech a časných embryích vysoce aktivní. Příčina snížené aktivity miRNA v myších vajíčkách je doposud neobjasněná. Tato diplomová práce pojednává o krátkých isoformách Argonautu, které byly objeveny v transkriptomu myších vajíček. Tyto jsou oproti Během mého výzkumu jsem vyizoloval mRNA kódující tyto krátké isoformy z myších oocytů a analyzoval jejich vliv na funkci miRNA a RNAi mechanismů v buněčných kulturách. S využitím luciferázového reporterového systému jsem zjistil, že ektopicky exprimované isoformy Argonautu neovlivňují aktivitu miRNA, ani RNAi v myších a lidských buňkách, a tedy pravděpodobně nefungují jako dominantně negativní inhibitor RNA umlčování.

Klíčová slova:

AGO, Argonaute, RNA, umlčování, siRNA, miRNA, interference, oocyt, RISC