

Cel badań i stawiana hipoteza

W mechanizmie regulacji ekspresji genów można wyróżnić trzy główne poziomy: regulacja procesu transkrypcji, regulacja stabilności transkryptu i regulacja procesu translacji. W projekcie zajmujemy się drugim poziomem, oddziaływaniami mRNA z microRNA i ich modulacją. Na podstawie badania komórek eksponowanych na promieniowanie jonizujące, oznaczania w nich poziomu transkryptów, pojawiania się uszkodzeń oksydacyjnych w cząsteczkach RNA i reaktywnych form tlenu oraz przeprowadzeniu symulacji modelowych, stawiamy hipotezę, że nieopisanym dotychczas elementem w mechanizmie regulacji ekspresji genów jest modulacja oddziaływań microRNA z mRNA poprzez wprowadzanie modyfikacji oksydacyjnych do cząsteczek RNA.

Znany z literatury sposób zmiany regulacji ekspresji genów za pomocą miRNA polega na odpowiedniej zmianie tempa transkrypcji miRNA w odpowiedzi na czynnik zewnętrzny, co z kolei pociąga zmianę ekspresji mRNA. Wyniki przeprowadzonych w naszym zespole eksperymentów laboratoryjnych sugerują inny, szybszy mechanizm regulacji ekspresji za pomocą miRNA, który może mieć miejsce nawet przy niezmienionej ekspresji miRNA, a polegający na modulacji interferencji RNA. Zgodnie z nim możliwe jest przewidzenie zmian mRNA w krótkim horyzoncie czasu jedynie na podstawie znajomości poziomów miRNA i mRNA w chwili początkowej.

Celem obecnego projektu jest przeprowadzenie prac modelowych, symulacyjnych i eksperymentalnych w celu weryfikacji hipotezy o istnieniu nieopisanego dotychczas szybkiego mechanizmu regulacji ekspresji genów opartego o działanie modulacyjne wolnych rodników.

Cel ten chcemy osiągnąć realizując trzy główne zadania projektu: Zadanie 1 - Modelowanie procesu interferencji RNA z uwzględnieniem wpływu reaktywnych form tlenu, Zadanie 2 - Bioinformatyczna analiza sekwencji nukleotydowych transkryptów i miRNA uczestniczących w regulacji z udziałem reaktywnych form tlenu i Zadanie 3 - Przeprowadzanie eksperymentów mających na celu estymację parametrów modelu i jego weryfikację.

Metody badawcze

W dotychczasowych badaniach modelowych i eksperymentach mikromacierzowych wyłoniliśmy klasę mRNA, dla których prawdopodobną przyczyną zmiany poziomu po napromienieniu była zmiana oddziaływania z miRNA. Przy użyciu narzędzi bioinformatycznych planujemy szczegółowe scharakteryzowanie sekwencji nukleotydowych i motywów rozpoznawanych przez różne komórkowe czynniki regulacyjne w tej grupie transkryptów. Rola znalezionych motywów sekwencyjnych, które mogą być ważne dla postulowanego mechanizmu regulacji weryfikowana będzie w eksperymentach biologicznych poprzez konstrukcję genów reporterowych zawierających takie motywy, wprowadzanie ich do komórek i badanie ich ekspresji w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez promieniowanie jonizujące lub wewnętrzne mechanizmy komórkowe. Planujemy scharakteryzowanie modyfikacji pojawiających się w cząsteczkach RNA zarówno pod wpływem zewnętrznych czynników indukujących stres oksydacyjny jak i w sytuacjach kiedy komórka sama intensywnie produkuje reaktywne formy tlenu. Poziomy miRNA i mRNA w komórkach badane będą przy użyciu mikromacierzy firmy Agilent, ekspresja genów reporterowych przy użyciu RT-qPCR, poziomy reaktywnych form tlenu za pomocą markerów fluorescencyjnych.

Znaczenie rezultatów

Opisanie nieznanego elementu w mechanizmach regulacji ekspresji genów potwierdzone modelem pozwalającym na przewidywanie zachowania komórek w zależności od poziomu reaktywnych form tlenu i wolnych rodników jest ważne z poznawczego punktu widzenia i daje perspektywę nowych celów dla terapii i diagnostyki w medycynie.