

Molekularne mechanizmy regulacji rozwoju zwierząt od zapłodnionej komórki jajowej do dorosłego organizmu należą do jednych z najbardziej fascynujących problemów biologii molekularnej i komórkowej. Dotychczasowe badania wskazują, że regulacja rozwoju organizmu kręgowców jest związana z ekspresją genów *hox*. W posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów biorą udział liczne białka takie jak czynniki transkrypcyjne, białka z rodziny Polycomb oraz inne. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o udziale w tych procesach niekodujących RNA (ncRNA).

W naszych badaniach zamierzamy się skupić na poznaniu roli ncRNA w rozwoju nerek. Jako model badawczy użyte zostaną hodowane ludzkie embrionalne komórki macierzyste, komórki embrionalne nerek oraz komórki izolowane z osobników dorosłych. Tak dobrane hodowle komórkowe odzwierciedlają procesy rozwoju nerek od postaci embrionalnej do osobnika. Ponadto chcemy zbadać wpływ ncRNA na procesy nowotworowe zachodzące podczas rozwoju nerek stosując hodowlę komórek nowotworowych, a uzyskane wyniki charakterystyki ncRNA zostaną odniesione do charakterystyki ncRNA występujących w tkance nowotworowej polskich pacjentów.

W komórkach eukariotycznych występuje kilka rodzajów ncRNA, przede wszystkim długie (lncRNA) powyżej 200 nt i małe (sncRNA) poniżej 200 nt. Ponadto do grupy sncRNA zalicza się microRNA, piRNA and tRF RNA będących w istocie fragmentami cząsteczek tRNA. Interesującym problemem jest potencjalny udział nowej rodziny ncRNA to jest kolistych RNA w procesach komórkowych. Zatem jakie ncRNA występują w komórkach nerek i jaka jest ich charakterystyka i funkcja. Doskonałą techniką pozwalającą uzyskać odpowiedź na to pytanie są metody sekwencjonowania nowej generacji. Zastosowanie metod rozwijanych przez firmę Illumina pozwoli na poznanie panoramy ncRNA występujących w komórkach nerek oraz określić zmiany ich ekspresji podczas rozwoju oraz procesów nowotworowych. Należy nadmienić, że technika ta została wcześniej wykorzystana do analizy sncRNA występujących w gonadach świni domowej (Kowalczykiewicz i wsp. PLoS ONE). Natomiast usunięcie wybranych ncRNA technikami „knockdown” pokaże, które ncRNA biorą udział w rozwoju nerek i mechanizmach powstawaniu raka.

Cechą charakterystyczną cząsteczek RNA jest tworzenie skomplikowanych struktur drugo i trzeciorzędowych, które są związane z ich funkcją w komórce. W celu wyjaśnienia funkcji poszczególnych rodzajów ncRNA w rozwoju nerek zamierzamy określić ich struktury stosując różne sondy.

Większość cząsteczek RNA występuje w formie kompleksów z różnymi białkami. Także ncRNA tworzą kompleksy z białkami, przy czym w przypadku lncRNA liczba oddziałujących białek jest rzędu kilkudziesięciu. Zamierzamy określić w warunkach *in vivo* stosując metodę zszywania białek do cząsteczek RNA w połączeniu z nowymi metodami sekwencjonowania jakie białka oddziałują z ncRNA w komórkach nerek,

Obecnie obserwuje się rosnące zainteresowanie epigenetyką RNA. Zamierzamy w testach komórkowych ustalić po pierwsze występowanie modyfikowanych nukleotydów w różnych rodzinach lncRNA oraz sncRNA oraz zmiany w obrazie modyfikacji związane z rozwojem komórek nerek oraz z procesami nowotworzenia.

Ważnym problemem, który zamierzamy rozwiązać jest ustalenie mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach nerek. Mamy zamiar przetestować hipotezę udziału ceRNA w tym mechanizmie. Opiera się ona na założeniu, że cząsteczki miRNA mogą się wiązać do wielu cząsteczek RNA (np. mRNA, lncRNA, ceRNA). W celu znalezienia sekwencji docelowych dla miRNA posłużymy się metodami bioinformatycznymi oraz potwierdzimy eksperymentalnie metodą fotozszywania wiązanie się miRNA do określonych sekwencji docelowych dla wybranych lncRNA oraz circRNA.