Gra w ogony: Zrozumienie roli przetwarzania 3'-końca długich niekodujących RNA podczas rozwoju Danio pręgowanego

Rozwój każdego z nas rozpoczyna się od pojedynczej komórki powstałej w momencie zapłodnienia z połączenia komórek rozrodczych żeńskiej i męskiej. Na tym etapie dziedziczymy od naszych rodziców materiał genetyczny, a mianowicie specjalną instrukcję warunkującą to, jacy będziemy. W dalszych etapach ta pojedyncza komórka, zwana zygotą ulega wielokrotnym podziałom, migracji i sprecyzowanemu różnicowaniu w celu wytworzenia narządów wewnętrznych i ostatecznie w pełni funkcjonalnego organizmu ludzkiego. Co ciekawe, pomimo widocznych różnic w wyglądzie i pełnionej funkcji, każda komórka naszego ciała zawiera dokładnie ten sam materiał genetyczny. To niezwykłe zjawisko uwarunkowane jest zatem przez ścisłą kontrolę rejonów naszego genomu, które w danym momencie i miejscu są aktywne. Rejony te, zwane genami zawierają informacje do tworzenia wszelkich cząstek niezbędnych do funkcjonowania naszego organizmu. Przez długi czas uważano, że geny kodujące białka (ang. messenger RNA, mRNA), molekuły pełniące funkcje wykonawcze i budulcowe, są główną częścią genomu ludzkiego. Na początku XXI wieku okazało się jednak, że geny te stanowią jedynie niespełna 2% naszego DNA, przy czym reszta tzw. niekodująca część również może być aktywna, produkując cząsteczki RNA o istotnych funkcjach regulacyjnych. Największą i najbardziej zróżnicowaną klasą pośród genów niekodujących białek są długie niekodujące RNA (ang. Long non-coding RNA, lncRNA). W przeciwieństwie do mRNA aktywność lncRNA, a więc ich pojawianie się i znikanie ogranicza się do odpowiednich punktów czasowych lub do określonego typu komórek. Ta ściśle określona aktywność świadczy zatem, że lncRNA mogą pełnić istotną funkcję we wczesnej embriogenezie. Rzeczywiście wiele z długich niekodujących RNA okazało się być biologicznie ważne np. w różnicowaniu komórek i tworzeniu organów, jednakże pomimo usilnych starań większość z nich nadal nie ma poznanej funkcji. Dodatkowo nadal nie są znane mechanizmy warunkujące ich specyficzną i ściśle ograniczoną ekspresję. Ważną rolę w tym aspekcie wydaje się pełnić procesowanie 3'-końca, a szczególnie proces poliadenylacji. Proces ten polega na dodawaniu do cząsteczek RNA ogonów składających się z wielokrotnie powtórzonych zasad adenozynowych, które stabilizują cząsteczkę RNA oraz zabezpieczają ją przed degradacją. Długość oraz dokładny skład ogonów poliA warunkuje zatem okres "żywotności" RNA w komórce. Proces poliadenylacji mRNA jest szczegółowo poznany, natomiast aspekt ten jest niestety często pomijany dla lncRNA, zwłaszcza we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Ze względów etycznych, badanie wyżej wspomnianego mechanizmu na embrionach ludzkich jest niemożliwe. Zatem, aby zrozumieć biologię człowieka, wykorzystuje się zwierzęce organizmy, modelowe, które już w wielu przypadkach dostarczyły nam istotnych informacji o procesach fizjologicznych jak i patologicznych. Do badań związanych z wczesnym rozwojem organizmu niezwykle przydatny okazał się być Danio pręgowany. Istotnym aspektem, czyniącym go konkurencyjnym modelem jest fakt, iż zapłodnienie oraz embriogeneza Danio pręgowanego zachodzi poza organizmem matki, co znacznie ułatwia pozyskiwanie materiału do badań, pozwala na stałe monitorowanie jego etapów rozwojowych jak i znacznie usprawnia prowadzone badania funkcjonalne.

Aby zrozumieć rolę przetwarzania 3'-końców długich niekodujących RNA we wczesnym etapie rozwoju Danio pręgowanego, po pierwsze planujemy ustanowić innowacyjną metodę pozwalającą na skierowaną transkryptomiczną analizę lncRNA. Biorąc pod uwagę fakt, że lncRNA występują w komórce w bardzo małej ilości, metoda ta, poprzez zastosowanie rozwiązania CLS, będzie specyficznie zwiększać ich ilość w próbce. CLS wykorzystuje specjalnie zaprojektowane sondy molekularne zdolne do wychwytywania docelowych RNA z puli całkowitego RNA. Dodatkowo metoda przygotowania prób do sekwencjonowania trzeciej generacji zostanie zoptymalizowana w taki sposób, aby usprawnić analizę zarówno poliadenylowanych jak i niepoliadenylowanych lncRNA oraz jednoczesną dogłębną ocenę długości i składu zidentyfikowanych ogonów poliA. Kolejnym etapem będzie identyfikacja czynników, potencjalnie związanych ze zróżnicowanym statusem ogonów poliA, takimi jak ilość lub specyficzny okres występowania w komórce. W przeciwieństwie do mRNA długie niekodujące RNA ulegają szybszym zmianom w trakcie ewolucji, dlatego też tylko niewielka ich część zachowana jest pomiędzy odległymi organizmami takimi jak człowiek i ryba. Wydaje się jednak, że te zachowane lncRNA mogą pełnić istotną funkcję biologiczną. Porównaniu pod względem statusu poliadenylacji, poddane również będą niezmienne ewolucyjnie lncRNA do tych wykazujących szybsze tempo zmienności ewolucyjnej. Ostatecznie, na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowane zostaną lncRNA, które zostaną poddane eksperymentalnej walidacji. Poprzez blokowanie procesu poliadenylacji wybranych długich niekodujących RNA kontroli poddany zostanie ich potencjalny wpływ na wczesny rozwój embrionalny Danio pręgowanego. Uzyskane wyniki, nie tylko pozwolą na szersze zrozumienie aspektów biologicznych lncRNA, takich jak czynników regulujących ich występowanie w komórce oraz warunkujących ich funkcję w trakcie rozwoju. Co najbardziej istotne, wiedza ta może mieć kluczowe znaczenie dla projektowania terapii RNA skierowanych na leczenie chorób związanych z deregulacją i nieprawidłową funkcją lncRNA, np. chorób nowotworowych. Niestety rozwiązania te są niemożliwe do wdrożenia bez wcześniejszego dogłębnego zrozumienia biologii lncRNA, w czym przewidziane badania mają istotnie pomóc.