

Małe niekodujące RNA w regeneracji *Schmidtea mediterranea*

Annasha Dutta

Streszczenie

Wyplawki takie jak *Schmidtea mediterranea*, są płazińcami znanymi ze swoich niezwykłych zdolności regeneracyjnych i dlatego stanowią przedmiot badań naukowych od ponad dwóch stuleci. Odkrycia dokonane na przestrzeni ostatnich lat ujawniły wiele mechanizmów komórkowych i molekularnych, leżących u podstaw regeneracji. Nadal jednak wiele pytań pozostaje otwartych. Dotyczą one zwłaszcza roli krótkich niekodujących RNA (ang. *non-coding RNAs*, ncRNA), czyli grupy obejmującej najważniejsze cząsteczki regulujące ekspresję genów u *Metazoa*. Biorąc pod uwagę fakt, że *S. mediterranea* posiada geny będące homologami genów człowieka, w tym tych, których zaburzenia prowadzą do wystąpienia chorób dziedzicznych, lepsze zrozumienie procesów zachodzących u tego organizmu może dostarczyć wiedzy na temat uniwersalnych mechanizmów molekularnych.

Głównym celem niniejszej pracy była identyfikacja i charakterystyka krótkich ncRNA zaangażowanych w regenerację *S. mediterranea*, ze szczególnym uwzględnieniem tzw. fragmentów RNA – cząsteczek powstających z dojrzałych konstytutywnych ncRNA. Aby to osiągnąć, badania koncentrowały się na opracowaniu strategii zaburzenia puli ncRNA podczas regeneracji i ocenie skutków tego zaburzenia na kilku poziomach fizjologicznych. W związku z tym, u wyplawków reprezentujących bezpłciowy szczep *S. mediterranea* wyciszono ekspresję genu kodującego rybonukleazę *Smed Elac2*, biorącą udział w metabolizmie ncRNA. Następnie efekty tego wyciszenia zostały zbadane na poziomie fenotypowym, anatomicznym, komórkowym, ekspresji genów i krótkich ncRNA.

W wyniku wyciszenia ekspresji genu *Smed ELAC2*, na poziomie fenotypowym i anatomicznym zaobserwowano, odpowiednio, opóźnienie w regeneracji fotoreceptorów i nieprawidłowy rozwój pni nerwowych. Analiza na poziomie komórkowym doprowadziła do odkrycia u wyplawków komórek wielojądrzastych. Podczas gdy w warunkach wyciszenia *Smed ELAC2* podstawowe populacje komórek niezróżnicowanych pozostały nienaruszone w trakcie regeneracji, w komórkach wielojądrzastych zaobserwowano wzrost liczby jąder. Szczegółowa charakterystyka tych komórek przy użyciu cytometrii przepływowej z obrazowaniem i sortowania aktywowanego fluorescencją ujawniła, że są to duże komórki występujące w warunkach homeostazy i prawdopodobnie mają charakter progenitorów

epidermalnych. Analizy ekspresji genów i ich ontologii pozwoliły zidentyfikować kluczowe procesy, które zostały ograniczone w wyniku wyciszenia *Smed ELAC2*. Były to: proliferacja komórek, funkcjonowanie komórkowych szlaków migracyjnych, procesy rozwojowe i sygnalizacja synaptyczna - kluczowe elementy w kontekście regeneracji. W wyniku przeprowadzonych badań, zidentyfikowano także krótki ncRNA niezbędny do prawidłowego przebiegu regeneracji: połówkę 5' tRNA Gly-GCC (ang. *5' tRNA half Gly-GCC*, 5' tRNAh Gly-GCC). Poziom akumulacji tej cząsteczki wyraźnie obniżał się podczas niedoboru rybonukleazy *Smed Elac2*, co wskazywało, że enzym ten bierze udział w biogenezie 5' tRNAh Gly-GCC. Wyniki badań funkcjonalnych *in vivo* ujawniły że 5' tRNAh Gly-GCC pełni rolę regulatorową i wycisza gen kodujący receptorową białkową fosfatazę tyrozynową. Podwyższona ekspresja tego genu w warunkach wyciszenia *Smed ELAC2* wydaje się być związana z wzrostem liczby jąder komórek wielojądrzastych i ograniczeniem funkcjonowania szlaków migracji komórek.

Podsumowując, przedstawione w tej pracy dane na temat: (i) udziału *Smed Elac2* w biogenezie 5' tRNAh Gly-GCC, (ii) znaczenia funkcjonalnego tego ncRNA oraz (iii) komórek wielojądrzastych, poszerzają wiedzę na temat regeneracji wypławków i otwierają perspektywy dalszych badań zachowawczej ewolucyjnie roli ncRNA w różnych kontekstach biologicznych.