

Wszystkie organizmy na Ziemi przechowują informację genetyczną w postaci DNA o określonej sekwencji nukleotydów. Od informacji tej zależy, jak organizm będzie się rozwijał, funkcjonował i reagował na bodźce z otoczenia. Jednak nie wszystkie geny są aktywne w danym czasie i miejscu, a precyzyjna regulacja ich aktywności jest kluczowa dla organizmu. Organizmy jednokomórkowe (eukariotyczne) mają DNA upakowane przez specjalne białka - histony - w strukturę zwaną chromatyną. Nie tylko pozwala to na pomieszczenie i przestrzenne uporządkowanie materiału genetycznego, ale również, przez zmiany kondensacji tej chromatyny, na regulację jego dostępu do różnych procesów. Dotyczy to również maszyneryi aktywujących geny (przeprowadzających ich ekspresję) - histony mogą służyć zasłanianiu sekwencji DNA w zwartej lub odsłanianiu w rozluźnionej chromatynie i zależnie od tego maszyneria ta nie może albo może się przyłączyć do sekwencji. Zmiany w oddziaływaniach między DNA a histonami zachodzą również innymi przez dodawanie specyficznych grup chemicznych do białek histonowych. Jedną z takich zmian modyfikacji jest acetylacja czyli dodanie grupy acetylowej do określonych aminokwasów w histonach przez specjalne kompleksy enzymatyczne zwane acetylotransferazami histonowymi. Zasadniczo acetylacja powoduje rozluźnienie struktury chromatyny i udostępnienie DNA dla innych białek, stąd jej występowanie wiązane jest z aktywacją genów i ich ekspresją. Modyfikacja ta, jej wpływ na ekspresję genów i enzymy jest wprowadzającą zakonserwowane w wiecie wywim - co oznacza, że są bardzo podobne u nawet niespokrewnionych ze sobą gatunków, co jeszcze bardziej potwierdza ich znaczenie.

Takim bardzo ważnym kompleksem acetylotransferazy u gatunku modelowego, jakim są drożdże piekarskie, jest kompleks złożony z kilkunastu białek o nazwie NuA4. Bierze on udział w acetylacji histonów w genach, co umożliwia ich aktywację. Badanie składu i roli poszczególnych podjednostek takich kompleksów jest trudne i trudne, ale wiadomo, że NuA4 ma swój odpowiednik także u ludzi. Dotychczas niewiele wiadomo o roślinnej wersji tego kompleksu - czy składa się z podobnych części, czy przeprowadza te same reakcje acetylacji, czy kontroluje w podobny sposób procesy związane z DNA. Dotychczas znaleziono w roślinnym gatunku modelowym *Arabidopsis* odpowiedniki tylko trzech podjednostek NuA4, o których wiadomo, że mają związek z acetylacją histonów. Nam niedawno udało się odkryć i opisać kolejną podjednostkę, którą nazwaliśmy *AtEAF1*, ponieważ uważamy ją za odpowiednik drożdżowego białka EAF1. U drożdży EAF1 pełni szczególną funkcję - służy jako platforma, do której przyłączają się kolejne składniki NuA4, tworząc cały kompleks. Najważniejsze znaczenie ma ono w rejonach genów zwanych promotorami, ponieważ w innych miejscach genu mogą przyłączać się poszczególne części kompleksu. Promotory natomiast są bardzo istotne dla działania genów, ponieważ to właśnie do nich przyłączają się białka odpowiadające za ich ekspresję, czyli odczytywanie informacji genetycznej.

Pytanie, na jakie chciałabym w tym projekcie udzielić odpowiedzi, brzmi: czy również funkcje EAF1 w aktywacji genów są zachowane w jego roślinnym odpowiedniku? Czy *AtEAF1* odpowiada za prawidłową acetylację histonów w promotorach genów i tym samym reguluje ich aktywność? Odpowiedzi nie tylko wzbogacą nasz wiedzę o tym, jakie mechanizmy molekularne zachodzą w królestwie roślin, ale także pozwolą na porównanie, jak ekspresja genów "zarządzają" różne organizmy, jak u nich zachodziła ewolucja tych "metod" kontroli genów.

U *Arabidopsis* występują dwa prawie identyczne geny *AtEAF1A* i *AtEAF1B*. Człysto punktem wyjścia do analiz funkcji genów jest uszkodzenie badanych genów i sprawdzenie, jak będzie to miało wpływ na organizm. Dla *Arabidopsis* dostępnych jest wiele linii z już uszkodzonymi genami, nie ma jednak takiej, w której oba geny *AtEAF1* byłyby wyłączone, nie można na ten ich uzyskać przez krzyżówki genetyczne.

Dlatego planuję wykorzystać nowoczesną technikę opartą na systemie o nazwie CRISPR/Cas9 do ukierunkowanego uszkodzenia obu genów naraz. Polega ona na wprowadzeniu do rośliny białka, które nakierowane specyficznymi fragmentami RNA pasującymi do sekwencji tych genów, potrafi je przecinać. W dalszej konsekwencji prowadzi to do nieodwracalnego uszkodzenia i wyłączenia genu. Udało się nam już wstępnie uzyskać takie rośliny z wyłączonymi obydwoma genami. Są one powoli zmienione w stosunku do rośliny typu dzikiego - małe, rosną bardzo powoli i mają bardzo blade liście oraz nieplodny pyłek. Chciałabym sprawdzić, jakie geny są w nich rozregulowane - które ze wszystkich genów mają większą ekspresję niż w roślinach typu dzikiego, a które nie są. Będzie to możliwe dzięki zastosowaniu techniki RNA-seq, która pokazuje jednocześnie poziomy aktywności wszystkich genów w danym momencie. Mam nadzieję wyłowić grupę genów o zaburzonej ekspresji, które będą tłumaczyły zmiany fenotypowe (wygląd i rozwój rośliny). Następnie dla kilku-kilkunastu rozregulowanych genów będę chciała poznać zmiany w acetylacji histonu H4, zwłaszcza w rejonie promotorowym. W tym celu za pomocą specyficznego przeciwciała rozpoznającego zacytylowany histon wyłowię wszystkie fragmenty DNA z nim związane (na tym polega tzw. immunoprecypitacja chromatyny), a potem porównam ich ilość dla linii mutantów i linii typu dzikiego. Otrzymane wyniki powinny pozwolić na powiązanie braku aktywnych białek *AtEAF1A/B* z poziomem acetylacji promotora i ekspresją genu. Ponadto posiadam również linie mutantów odpowiedników innych podjednostek kompleksu NuA4, o podobnych, lecz w różnym stopniu nasilonych zmianach w wyglądzie, i w nich również chciałabym sprawdzić, czy podobne geny ulegają rozregulowaniu, i czy podobnie zmieniona jest ich acetylacja H4. Pewnie również bym mogła wskazać na zróżnicowanie roli poszczególnych jednostek w roślinnym odpowiedniku kompleksu NuA4.