

Genom każdej komórki organizmu jest taki sam (z nielicznymi wyjątkami, jak na przykład ssacze limfocyty). Genom zbudowany jest na bazie czterech „liter” DNA, których cięgi kodują informację genetyczną. Chociaż wszystkie komórki zawierają ten sam zestaw informacji, w zależności od typu różni się historia rozwojowa, morfologia i funkcja. Różnice te wynikają z faktu, iż komórki w różny sposób wyrażają ten sam genom. Dzieje się tak ponieważ ekspresja genów jest kontrolowana, nie tylko przez sekwencje DNA, ale również przez epigenetyczne markery, które znajdują się bezpo­rednio na DNA (jako metylowana lub hydroksymetylowana cytozyna) bądź na histonach, na które owinięta jest ni­ DNA.

W moich badaniach skupię się na kontroli ekspresji genów u roślin, a dokładniej u modelowej rośliny jak jest rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*). Roślina ta jest członkiem rodziny kapustowatych, i jest powszechnie stosowana w badaniach genetycznych. *Arabidopsis* sprawdza się jako model m. in. ze względu na niewielki rozmiar i stosunkowo krótki cykl życiowy (od czterech do sześciu tygodni), który umożliwia badanie skutków zmian genetycznych przez kilka pokoleń. Ponadto *Arabidopsis* ma mały genom, a do dyspozycji naukowców jest duży zbiór komercyjnie dostępnych mutantów, które ułatwiają przeprowadzenie wielu doświadczeń. Pomimo, że *Arabidopsis* nie przedstawia walorów ekonomicznych, to jest reprezentantem grupy roślin (z rodzaju kapusty i gorczyca), które mają duży wpływ na gospodarkę i handel. Odkrywaj one ważną rolę w wyżywieniu ludności świata i mogłyby również być przydatne do produkcji biopaliw.

Jednym z lepiej poznanych markerów epigenetycznych jest metylacja DNA, kowalencyjna modyfikacja DNA, która zmienia i zazwyczaj hamuje ekspresję genów. Dzięki skomplikowanej maszynarii epigenetycznej, która współdziała z maszyną replikacji DNA, niektóre wzorce metylacji DNA są dziedziczne. Ja jestem zainteresowany metylacją DNA, która nie jest bezpośrednio dziedziczna przy podziale komórek, jest natomiast kontrolowana przez małe cząsteczki RNA, które ukierunkowują maszynę epigenetyczną. Rdzenną maszynę epigenetyczną stanowi białko o nazwie DRM2 (metylotransferaza o przearanżowanych domenach 2), które składa się z dwóch podstawowych części: domeny katalitycznej i przewodnika. Funkcją domeny katalitycznej jest „wpisanie” metylacji w DNA podczas gdy przewodnik funkcjonuje najprawdopodobniej podobnie do ręki, która prowadzi pióro. Wiadomo, że cząsteczka białka białca przewodnikiem jest zachowawcza u różnych roślin, a przeprowadzone doświadczenia biochemiczne wykazały, że utrata tej części zakłóca proces „wpisywania”. W trakcie realizacji niniejszego projektu planuję zbadać rolę niekatalitycznej składowej metylotransferazy DRM2 wykorzystując w tym celu różne techniki genetyczne, biochemiczne i biofizyczne.

Katalityczna część metylotransferazy DRM2 została już stosunkowo dobrze poznana. Część niekatalityczna, białca moim obiektem badań, składa się z trzech domen zasocjowanych z ubikwityn (UBA). Wyniki wcześniejszych doświadczeń wskazują, że są one istotne dla funkcji DRM2. Planuję wyjaśnić, jak domeny UBA kontrolują aktywność DRM2 i czy istotnie są zaangażowane w prowadzenie DRM2 do miejsc w DNA, gdzie powinna zostać przeprowadzona modyfikacja? A także, czy istnieje podział zadań między różnymi domenami UBA i czy każda z osobna odpowiada za podzbiór docelowych sekwencji DNA dla DRM2? Byłoby również ciekawe dowiedzieć się, czy domeny UBA kontrolują funkcję katalityczną DRM2 na różnych etapach rozwoju rośliny? Tak czy inaczej, planuję również poznać partnerów wiązanych przez domeny UBA oraz zbadać czy UBA są bezpośrednio zaangażowane w rozpoznawanie innych markerów epigenetycznych chromatyny (na przykład modyfikacji histonów), czy też mogą współdziałać z innymi białkami, które mają taką zdolność? Dla poznanych partnerów domen UBA planuję zbadać szczegóły ich oddziaływanie na poziomie molekularnym.

W celu poznania roli poszczególnych domen UBA, zostanie wykonany szereg eksperymentów genetycznych. Izogeniczne linie roślin, pozbawionych genu DRM2 są już komercyjnie dostępne. Do takich roślin wprowadzę gen DRM2 dzikiego typu (jako pozytywny kontrol), fragment genu DRM2 kodujący wyłącznie domenę katalityczną (jako negatywny kontrol), a także skrócone wersje genu DRM2, w których usunięte zostaną rejon kodujące poszczególne domeny UBA lub ich kombinacje. Następnie planuję monitorować metylację DNA zależną od DRM2 (technicznie nazywaną metylacją CHH zależną od kontekstu sekwencji DNA) w transgenicznym liniach roślin za pomocą sekwencjonowania ich genomowego DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu. Ta technika sekwencjonowania opiera się na reakcji chemicznej deaminacji cytozyny ale nie metylocytozyny w obecności wodorosiarczyny sodu, co w konsekwencji pozwala wnioskować o stanie metylacji DNA.

Aby zrozumieć, jak domeny UBA nakierowują DRM2 do różnych docelowych loci w genomie, podejmę próby badania partnerów wiązanych przez poszczególne domeny UBA lub kombinacje domen UBA (jeśli eksperymenty genetyczne zasugerują, że domeny UBA mogą współdziałać). W tym celu domeny UBA zostaną zastosowane jako „przynęty”, a następnie wyłowieni partnerzy zostaną scharakteryzowani za pomocą spektrometrii mas. Aby zachować, jak to tylko możliwe, fizjologiczne warunki prowadzonego doświadczenia, domeny UBA będą wyrażane w transgenicznym liniach pod kontrolą regulatorowych regionów genomowych, które naturalnie uczestniczą w kontroli ekspresji genu DRM2 w liniach dzikiego typu.

Domeny UBA lub ich kombinacje zostaną również scharakteryzowane strukturalnie. Ponieważ wyrażanie tych białek w roślinach nie zapewni mi wystarczającej ilości materiału do badań krystalograficznych, domeny UBA będą również produkowane w systemie bakteryjnym *Escherichia coli*, genetycznie zmodyfikowanym i przygotowanym do takich celów. Otrzymane preparaty domen UBA będą poddane próbie uporządkowania *in vitro* w regularne formy zwane kryształami, które zostaną następnie zbadane z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego. Uzyskane w ten sposób wyniki dostarczą szczegółowych informacji na poziomie atomowym o tym jak domeny UBA są zbudowane i jak przebiega ich oddziaływanie z innymi cząsteczkami.