

Popularnonaukowe streszczenie projektu

Aby organizmy mogły funkcjonować w zmiennym środowisku konieczne są duże zdolności adaptacyjne. Zaczynają się one już na poziomie genomów poprzez m.in. regulację transkrypcji, modyfikacje potranslacyjne, alternatywne składanie genów czy epigenetyczne modyfikacje DNA. Do modyfikacji epigenetycznych DNA może zaliczyć takie procesy jak: metylacja, demetylacja (usuwanie grupy metylowej), deaminacja (usuwanie grupy aminowej) czy uracylowanie. Metylacja cytozyny do 5-metylocytozyny jest jedną z najczęstszych zmian tego typu. W reakcji tej biorą udział enzymy tzw. metylotransferazy DNA (DNMT). Wyróżniamy kilka metylotransferaz: DNMT1 (odpowiedzialną za powielanie wzoru metylacji podczas replikacji DNA), DNMT 3 (odpowiedzialną za metylację *de novo*) czy DNMT2 (odpowiadającą najprawdopodobniej za metylację tRNA).

Kilka kluczowych aspektów procesów epigenetycznych, dobrze poznanych u ssaków, pozostaje całkowicie nieodkrytych w organizmach niższych, takich jak bezkręgowce. Dla przykładu globalna demetylacja DNA ma miejsce podczas wczesnych etapów rozwoju zarodkowego ssaków, pozwalając na przeprogramowanie genomu niezbędne do prawidłowego rozwoju nowego organizmu. Do tej pory nie wiadomo, czy aktywna demetylacja jest równie ważna w przypadku bezkręgowców oraz czy u organizmów innych niż ssaki funkcjonuje szlak aktywnej demetylacji DNA.

Bardzo ważnym organizmem modelowym jest muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*). Przez wiele lat uważano, iż *Drosophila* utraciła zdolność do metylacji cytozyny (nie ma 5-metylocytozyny w swoim materiale genetycznym). Takie przypuszczenia wynikały z faktu, iż owady te nie posiadają pełnego systemu metylacji cytozyny (posiadają jedynie DNMT2). Jednakże dzięki wykorzystaniu nowoczesnych i czułych metod udało się oznaczyć niewielkie ilości 5-metylocytozyny zarówno na etapie rozwoju embrionalnego, jak i u dorosłych owadów. Co ciekawe, u *D. melanogaster* odkryto odpowiednik białek TET (*ang. Ten Eleven Translocation*), które są zaangażowane w proces aktywnej demetylacji DNA u ssaków. Wykazano, że enzym ten może katalizować reakcję utleniania 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny, a modyfikacja ta została wykryta u dorosłych muszek owocowych. Inną funkcją opisywanego białka może być produkcja 5-hydroksymetylouracylu. Nie wiadomo czy śladowe ilości metylowanej cytozyny, obserwowane w genomie *D.melanogaster*, wpływają na skomplikowany cykl rozwojowy muszki owocowej. Taką rolę przypisuje się uracylowi. W świetle dotychczasowych badań bardzo prawdopodobnym jest, że rolę znacznika molekularnego pełni na etapie rozwoju larwalnego obecny w DNA uracyl sparowany z adeniną. Wykazano niezwykłą akumulację uracylu w DNA u *D. melanogaster* zwłaszcza na etapie rozwoju larwalnego. Wydaje się, że taki niezwykły mechanizm, polegający na tolerancji i interpretacji obecności uracylu w DNA, przy braku aktywności glikozydazy uracylowej UNG (enzym usuwający uracyl z DNA), może być uniwersalny dla owadów holometabolicznych (ulegających przeobrażeniu zupełnemu). Bardzo możliwe jest, że również 5-hydroksymetylouracyl pełni rolę znacznika molekularnego.

W projekcie proponujemy poszukiwania nowych markerów epigenetycznych w materiale genetycznym muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Do zidentyfikowania i/lub oznaczenia ilościowego 5-metylocytozyny, 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny, 5-karboksycytozyny, 5-hydroksymetylouracylu, uracylu oraz 8-oxoguaniny (w formie deoksynukleozydów), w genomowym DNA, izolowanym z owadów w różnych stadiach rozwojowych, planujemy wykorzystać uważaną za „złoty standard” technikę UPLC-MS/MS, z wykorzystaniem standardów wewnętrznych, znakowanych stabilnymi izotopami. Planujemy również przeprowadzić doświadczenia na modelu *in vitro*. Do tego celu posłużą nam hodowle komórkowe linii S2 *Drosophila*.