

## **Popularno naukowe streszczenie projektu**

Celem projektu jest weryfikacja roboczej hipotezy o udziale lamin i topoizomerazy II w egigenetycznej regulacji ekspresji genów w układzie modelowym indukcji szoku termicznego w organizmie modelowym *Drosophila melanogaster*. U muszki owocowej indukcja szoku termicznego wiąże się z zablokowaniem transkrypcji wszystkich loci z wyjątkiem 6 loci – tzw. „heat shock loci” gdzie transkrypcja jest aktywowana. Daje to możliwość globalnej analizy procesu regulacji transkrypcji oraz jednoczesnej wizualizacji zmian na konkretnych loci na chromosomach politenicznych gruczołów śliniankowych larw stadium trzeciego.

Poznanie mechanizmu epigenetycznej regulacji ekspresji genów, a w szczególności molekularnych mechanizmów stojących za tym zjawiskiem jest jednym z kluczowych problemów biologii molekularnej i komórkowej mający swoje dalekosiężne implikacje nie tylko dla zrozumienia podstawowych relacji pomiędzy genotypem a fenotypem, ale także dla rozwoju medycyny i zaawansowanych metod terapii i inżynierii genetycznej. Mimo, że intensywne badania nad epigenetyczną regulacją ekspresji genów prowadzone są od dziesiątków lat wciąż daleko nam do zrozumienia wszystkich mechanizmów tego procesu. Większość dotychczasowych modeli badawczych koncentruje się na analizie szlaków sygnalizacyjnych i mechanizmach regulacji transkrypcji bezpośrednio mających wpływ na aktywność aparatu transkrypcyjnego na konkretnych genach i zmian epigenetycznych w obrębie tych genów ignorując niejako wpływ struktury szkieletu białkowego organizującego chromatynę na ekspresję genów.

Planowany projekt badawczy proponuje analizę mechanizmu molekularnego tego procesu w unikalnym modelu badawczym oferującym możliwość globalnej oceny zmian w strukturze genomu wraz z analizą kluczowych białek organizacyjnych i szkieletowych odpowiedzialnych na organizację przestrzenną genomu w jądrze komórkowym. Dodatkowym atutem projektu jest możliwość bezpośredniej wizualizacji zmian zachodzących na aktywnych i nieaktywnych loci technikami fluorescencyjnymi mikroskopii konfokalnej w połączeniu z technikami FISH i RISH (chromosomy politeniczne z gruczołów śliniankowych larw stadium trzeciego).

Wstępne dane eksperymentalne uzyskane w naszym laboratorium, wskazują na bardzo znaczące zwiększenie ilości i jakości wiązania chromatyny (zarówno, DNA jak i RNA oraz histonów) przez laminę Dm i topoizomerazę II *in vivo* po indukcji szoku termicznego oraz relokację tych białek po indukcji szoku termicznego. Wcześniejsze dane eksperymentalne potwierdzają, że indukcja szoku termicznego u muszki skutkuje indukcją relokacji wiązania topo II. Zidentyfikowano także kilka konserwatywnych miejsc wiązania DNA przez topo II indukowane szokiem termicznym. Opublikowane przez nas dane eksperymentalne wskazują, że zarówno u topo II jak i u laminy Dm regulacja wiązania DNA i chromatyny jest związana z ich specyficzną fosforylacją co sugeruje jaki mógłby być potencjalny mechanizm regulacji wiązania chromatyny i regulacji ekspresji genów w trakcie indukcji szoku termicznego. Dodatkowo, idea projektu wynika z kilku przesłanek związanych z właściwościami laminy Dm i topoizomerazy II u *Drosophila* oraz danych dotyczących funkcji sekwencji regulatorowych, SAR/MAR DNA, szkieletu jądrowego i chromosomowego oraz relacji między sekwencjami kotwiczącymi pętle chromatyny a laminą Dm i topoizomerazą II oraz lokalizacją w okolicy blaszki jądrowej.

Główny cel projektu, czyli zbadanie wybranych aspektów molekularnego mechanizmu regulującego proces epigenetycznego wyłączania transkrypcji genów indukowanego szokiem termicznym a w szczególności analiza roli lamin i topoizomerazy II w tym procesie w układzie modelowym *Drosophila melanogaster* realizowany będzie w kilku etapach.

Pierwszym celem projektu jest wykazanie fizycznego oddziaływania laminy Dm z topoizomerazą II oraz innymi białkami oraz udokumentowanie składu białkowego kompleksów białkowych zawierających laminę, topoizomerazę oraz białka oddziałujące z laminami (np. białka z domeną LEM, bicaudal, belle, HSP90) *in vitro* i *in vivo* w systemie *Drosophila*. Podjęta zostanie też próba identyfikacji regionów lamin i topoizomerazy II istotnych dla tych oddziaływań.

Drugim celem projektu jest wykazanie zmian *in vivo* w asocjacji z chromatyną kompleksów białkowych zawierających laminę, topoizomerazę II oraz białka z domeną LEM w odpowiedzi na reorganizację chromatyny związaną z całkowitym wyłączeniem transkrypcji genów indukowanym szokiem termicznym. Ponadto zostanie dokonana identyfikacja zmian potranslacyjnych modyfikacji histonów (np.: H3K9 tri metylowany oraz H3K27 acetylowany) indukowana szokiem termicznym na aktywnych i nieaktywnych loci oraz poziom asocjacji aktywnych i nieaktywnych kompleksów polimerazy RNA II ( bez fosforylacji w domenie CTD oraz pSer-2 i pSer-5 na domenie CTD) na tych loci.

Trzecim celem projektu jest udokumentowanie zmian w ekspresji, lokalizacji oraz interakcji/kolokalizacji lamin, topoizomerazy II, nukleoporyn typu F/G oraz białek z domeną LEM indukowanych szokiem termicznym. W tym etapie badań analizowany będzie też stopień asocjacji polimerazy RNA II z chromatyną i poszczególnymi aktywnymi i nieaktywnymi loci na chromosomach politenicznych komórek gruczołów śliniankowych larw stadium trzeciego muszki owocowej.