

Zmienność liczby kopii DNA (ang. *copy number variation*, CNV) to określenie odnoszące się do różnic w sekwencji genomowej osobników tego samego gatunku, przejawiających się zwiększeniem liczby lub utratą pewnych segmentów DNA - odpowiednio - poprzez ich duplikację lub delecję. Segmenty te niejednokrotnie obejmują regiony, w których zlokalizowane są geny kodujące białka, jednak nie tylko. Liczne badania nad CNV u ludzi wskazują, że w obszarach polimorficznych (tj. zmiennych) pod względem liczby kopii znajdują się również geny mikroRNA (nazywane dalej CNV-mikroRNA).

MikroRNA są małymi cząsteczkami RNA, które nie podlegają translacji. Ich funkcja polega na potranskrypcyjnej regulacji ekspresji (wyciszaniu) niektórych genów białkowych. W ten sposób mikroRNA uczestniczą w regulowaniu licznych procesów komórkowych. Duplikacja lub delecja genów mikroRNA, podobnie jak w przypadku polimorficznych genów kodujących produkty białkowe, może prowadzić do zmiany poziomu ekspresji tych genów, a co za tym idzie, do zwiększenia lub zmniejszenia ilości funkcjonalnych cząsteczek mikroRNA. W efekcie, różnice w liczbie kopii genów CNV-mikroRNA mogą przekładać się na zróżnicowanie ekspresji niektórych genów regulowanych przez te mikroRNA (tzw. genów docelowych), a to z kolei może przejawiać się różnicami na poziomie fenotypu. Istotnie, u człowieka pewne warianty CNV-mikroRNA powiązano między innymi z nowotworami, męską niepłodnością, czy zaburzeniami psychicznymi.

U roślin, jak dotąd, zmienność liczby kopii genów mikroRNA nie była badana. Biorąc pod uwagę zaangażowanie tych małych, niekodujących RNA w kontrolowanie zarówno licznych procesów wzrostowych i rozwojowych jak i w odpowiedź na stres, polimorfizm liczby kopii genów mikroRNA może mieć znaczenie na każdym etapie rozwoju rośliny i być korzystny lub nie dla jej adaptacji do warunków środowiska. Dlatego celem tego projektu jest zbadanie, w jakim stopniu CNV obejmuje geny mikroRNA w populacji rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* i czy geny kodujące białka, regulowane przez zweryfikowane CNV-mikroRNA, w istocie wykazują różnice w poziomie ekspresji, skorelowane z różnicami w liczbie kopii genów mikroRNA zaangażowanych w ich regulację.

*A. thaliana* to model roślinny, który doskonale nadaje się do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Dla tego gatunku istnieją dostępne obszernie dane o sekwencji genomów, transkryptomów oraz epigenomów ponad tysiąca naturalnych odmian (ekotypów). Porównując dane genomowe dla tych ekotypów byliśmy w stanie wytypować grupę kilkudziesięciu genów mikroRNA, które mogą podlegać CNV. Dzięki wcześniejszemu opracowaniu i zoptymalizowaniu metod genotypowania CNV u *A. thaliana*, możliwa będzie eksperymentalna weryfikacja bioinformatycznych przewidywań, co zaplanowano w niniejszym projekcie. Dla pozytywnie zweryfikowanych CNV-mikroRNA zostaną przeprowadzone analizy na skalę populacyjną z wykorzystaniem metody multipleksowej zależnej od ligacji amplifikacji sond (MLPA). Umożliwia ona jednoczesną analizę zmienności nawet 30 regionów (w tym wypadku CNV-mikroRNA) i pozwoli na przebadanie około 1000 różnych ekotypów. Dzięki temu zostanie określony stopień i rodzaj polimorfizmu badanych CNV-mikroRNA (polimorfizm typu obecność/brak genu, bądź delecje i duplikacje albo duplikacje różnego stopnia - zależnie od ekotypu i genu mikroRNA). Ostatnim etapem analizy będzie sprawdzenie, czy geny docelowe (zidentyfikowane i wybrane na podstawie literatury oraz internetowych baz danych) dla tych CNV – mikroRNA, które podlegają delecji, wykazują zmienioną ekspresję. Pozwoli to wnioskować o istnieniu bądź braku regulacyjnej zależności pomiędzy parami CNV-mikroRNA: gen docelowy oraz przysłuży się w weryfikacji prawdziwych genów docelowych dla stosunkowo młodych mikroRNA, o których roli, a nawet funkcjonalności, nadal niewiele wiadomo. Badanie ekspresji genów docelowych obejmie szereg tkanek roślinnych i zostanie przeprowadzone z wykorzystaniem techniki ddPCR, która umożliwi precyzyjny pomiar bezwzględnej liczby badanych cząsteczek (w tym przypadku cDNA) w próbce. Dodatkowo wykorzystane zostaną także dostępne publicznie dane sekwencyjne transkryptomów dla badanych ekotypów *A. thaliana* (tzw. dane RNA-Seq).

Wyniki uzyskane w efekcie realizacji niniejszego projektu rzucą światło na - dotychczas niezbadane - zjawisko CNV-mikroRNA u roślin. Dzięki określeniu jego wpływu na zmianę ekspresji genów docelowych możliwe będzie dalsze wnioskowanie odnośnie funkcjonowania mikroRNA i znaczenia CNV-mikroRNA dla adaptacji i ewolucji *A. thaliana*.