

Tytuł projektu: Zastosowanie technologii CRISPR-Cas9 do wyjaśnienia czy zmiany architektury jądra interfazowego w trakcie adipogenezy są przyczyną czy skutkiem aktywności transkrypcyjnej genów.

Proces powstawania komórek tłuszczowych, określane mianem adipogenezy, jest intensywnie badany zarówno w naukach biomedycznych, ze względu na coraz większy problem otyłości, jaki i w naukach o zwierzętach, gdyż tkanka tłuszczowa wpływa na ważne cechy hodowlane, takie jak przeżywalność noworodków czy wzrost zwierząt. Na odkładanie tkanki tłuszczowej wpływają zarówno czynniki środowiskowe (np. dieta, aktywność fizyczna) jak i genetyczne (np. mutacje i polimorfizmy genów) oraz interakcje między nimi. W ostatnich latach zwraca się również coraz większą uwagę na rolę w tym procesie mechanizmów epigenetycznych, takich jak metylacja DNA czy modyfikacje histonów. Stosunkowo nowym obszarem badawczym jest tzw. architektura jądra interfazowego, która zajmuje się tym jak położenie chromosomów i genów w trójwymiarowej przestrzeni jądra komórkowego może determinować ekspresję genów a tym samym wpływać na funkcjonowanie komórek. Nasze wcześniejsze badania prowadzone na modelu adipogenezy *in vitro* dowiodły, że geny znacznie silniej aniżeli chromosomy podlegają dynamicznej reorganizacji w jądrze komórkowym i te zmiany położenia genów korelują z poziomem ich transkrypcji. Geny od swojego terytorium chromosomowego przemieszczały się formując tzw. pętle chromatynowe jednakże mechanizm tych zmian nie został do tej pory dobrze poznany. Niniejszy projekt jest rozwinięciem tych badań w oparciu o nowoczesne metody badania i edytowania genomu. Głównym celem projektu jest poznanie mechanizmu przemieszczania się genów kodujących kluczowe czynniki transkrypcyjne adipogenezy w przestrzeni jądra komórkowego w procesie różnicowania i odpowiedź na pytanie czy tworzenie pętli/domen chromatynowych jest niezbędne do aktywacji genu czy jest tylko konsekwencją organizacji chromatyny wyższego rzędu, która jest charakterystyczna dla danego stadium różnicowania komórek. Badania prowadzone będą na świni domowej, która poza tym, że jest ważnym gatunkiem gospodarskim uznawana też jest bardzo dobrym gatunkiem modelowym do badania otyłości człowieka. Zastosowane zostaną techniki wizualizacji badanych *loci* na poziomie pojedynczej komórki przy wykorzystaniu zmodyfikowanej wersji techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (3D-FISH). Wysokorozdzielcze mikroskopowanie pozwoli na precyzyjną obserwację dynamiki formowania się domen chromatynowych w trakcie różnicowania. Domeny te będą badane pod kątem występowania wybranych znaczników epigenetycznych, czyli modyfikacji histonów w oparciu o technikę immunoprecypitacji chromatyny (ChIP). Aby móc wnioskować o skutkach lub przyczynach formowania się pętli chromatynowych w projekcie zastosowana będzie technika inżynierii genetycznej, która w ostatnich latach zrewolucjonizowała badania nad edytowaniem genomu, czyli metoda CRISPR/Cas9, określana mianem „molekularnych nożyczek”. Dzięki precyzyjnemu wycięciu fragmentu DNA regulującego działanie wybranego genu, zostanie dokonana jego inaktywacja. Następnie domeny chromatynowe zawierające badany gen zostaną poddane analizie przy zastosowaniu wyżej wymienionych metod. Jeżeli pętle chromatynowe będą ciągle obecne, mimo braku ekspresji genu, będzie to świadczyło o tym, że ich formowanie nie jest bezpośrednio powiązane z aktywacją transkrypcyjną genu. Jeśli natomiast nie zaobserwuje się w jądrach zmodyfikowanych komórek pętli chromatynowych, będzie to wskazanie, że formowanie pętli chromatynowych jest ściśle powiązane z aktywacją transkrypcją genów kluczowych dla adipogenezy. Szczegółowe poznanie mechanizmów regulujących ekspresję genów na poziomie jądra komórkowego umożliwi opracowanie nowych metod pozwalających na modulowanie ekspresją genów, co będzie mogło być wykorzystane w przyszłości w terapii chorób (np. otyłości) czy do modyfikowania cechy ważnych z punktu widzenia hodowli zwierząt (np. otluszczenia).