

Genomy organizmów eukariotycznych są upakowane w jądrze komórkowym jako kompleks białek i DNA nazywany chromatyną. Chromatyna nie jest tylko komórkowym magazynem DNA, ale również strukturą odpowiedzialną za odczytywanie informacji genetycznej w odpowiedni sposób w odpowiednim czasie. Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom – szpulka, na którą nawinięte jest ~150 par zasad DNA. Nukleosom składa się z 8 cząsteczek histonów rdzeniowych czterech typów (H2A, H2B, H3, H4) oraz DNA. Histon łącznikowy (H1) jest białkiem, które wiąże się z zewnątrz nukleosomu i spina nici DNA wychodzące z nukleosomu. H1 związany do nukleosomu sprzyja zagęszczaniu chromatyny i zmniejszeniu dostępności informacji zapisanej w DNA. Histon H1 jest zbudowany z konserwowanej w ewolucji domeny globularnej (GH1) oraz nieustrukturyzowanych końców zwanych „ogonami”. Zarówno ogony, jak i domena GH1 jest silnie zasadowa.

Histon H1 jest bardzo ważnym elementem regulacji dostępności chromatyny, a co za tym idzie ekspresji genów. Histon H1 w jądrze komórkowym znajduje się w stanie równowagi dynamicznej pomiędzy cząsteczkami związanymi i niezwiązanymi z chromatyną. Zmiana powinowactwa H1 do nukleosomu może przesuwać tę równowagę i zakłócać homeostazę komórki. H1 zarówno u roślin, jak i u zwierząt podlega licznym modyfikacjom potranslacyjnym polegającym najczęściej na dołączeniu grup chemicznych do aminokwasów tworzących białko. Modyfikacje te, szczególnie w obrębie domeny GH1, mogą zmieniać powinowactwo H1 do nukleosomu, co nie zostało jeszcze zbadane.

Mutacje zmniejszające poziom histonu H1 u zwierząt wyższych (np. u ssaków) o połowę powodują śmierć zarodków na wczesnych etapach rozwoju. W przeciwieństwie do zwierząt rośliny mogą żyć bez histonu H1. Rośliny rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) pozbawione H1 (poprzez mutacje wszystkich genów kodujących H1), pomimo dużych zmian w strukturze jądra komórkowego, nie wykazują widocznych gołym okiem zmian fenotypowych. Dostępność żywotnych mutantów pozbawionych H1 czyni rośliny dobrym modelem do badań skutków jego braku. Przyczyny żywotności roślin pozbawionych histonu H1 nie zostały dotąd poznane. Można postawić dwie hipotezy badawcze, które mogą to wyjaśniać: 1) występowanie innych białek, które mogą łączyć się do nukleosomu podobnie, jak H1; 2) występowanie innych mechanizmów regulacyjnych, które mogą złagodzić zakłócenia w funkcjonowaniu chromatyny spowodowane brakiem H1. Obie hipotezy mogą być prawdziwe – rośliny mogą posiadać białka, które łączą się do nukleosomu, jak histon H1, częściowo go zastępując. Resztę zakłóceń w regulacji uzupełniają inne mechanizmy. Rośliny w przeciwieństwie do zwierząt posiadają inne białka zawierające domenę GH1. Białka te nie posiadają typowych dla H1 silnie zasadowych „ogonów”, ale mogą posiadać inne domeny lub motywy wiążące DNA, których brak w H1. Jedno z takich białek mogłoby zastępować H1 na nukleosomie.

Pierwszym celem projektu jest znalezienie białek zastępujących histon H1 na nukleosomie oraz białek uczestniczących w mechanizmach kompensujących brak H1. Cel ten będzie zrealizowany poprzez pocięcie chromatyny roślin kontrolnych i pozbawionych H1 na kilkunukleosomowe fragmenty, a następnie identyfikacja białek związanych z nimi. Na podstawie zebranych danych zidentyfikujemy także modyfikacje histonów rdzeniowych i łącznikowych związanych z nukleosomami. W celu znalezienia białek, których ilość zmieniła się na skutek usunięcia H1, przeanalizowane zostaną także proteomy całych jąder komórkowych roślin kontrolnych i pozbawionych H1. Chcemy w ten sposób znaleźć białka zaangażowane w procesy kompensujące brak H1. Do identyfikacji i porównania stężeń białek użyte zostaną wysokoprzepustowe metody proteomiczne opierające się na spektrometrii mas. Zastosujemy podejście typu ‘shot-gun’ polegające na trawieniu endoproteazą wszystkich białek z próbki. Powstałe w ten sposób peptydy są rozdzielane w wysokosprawnym chromatografie cieczowym połączonym ze spektrometrem mas. Spektrometr mas mierzy masy peptydów, selekcjonuje określone peptydy, poddaje je fragmentacji i mierzy masy fragmentów. Dane otrzymane w ten sposób razem z genomowymi bazami danych pozwalają na identyfikację peptydów i białek.

Drugim celem projektu jest sprawdzenie wpływu modyfikacji potranslacyjnych na powinowactwo histonu H1 do nukleosomu. Cel ten zostanie osiągnięty poprzez przygotowanie nukleosomów *in vitro* (metoda nazywana rekonstytucją nukleosomów *in vitro*) z histonów i DNA wyprodukowanych w genetycznie zmodyfikowanych bakteriach i wiązanie do nich histonu H1 lub domeny GH1. Powinowactwo do nukleosomu zostanie oznaczona poprzez monitorowanie metodami kalorymetrycznymi uwalniania energii w czasie wiązania. W ten sposób zbadane zostaną roślinne i zwierzęce domeny GH1 z i bez modyfikacji potranslacyjnych. Białko H1 do badań zostanie wyprodukowane w bakteriach. Domena GH1 z i bez modyfikacji potranslacyjnych zostanie wyprodukowana metodą chemicznej syntezy peptydów na złożu stałym. W metodzie tej do pierwszego aminokwasu przyłączonego do złoża dołączane są kolejne aminokwasy. Metoda ta zostanie użyta, gdyż produkcja białka zmodyfikowanego w odpowiedni sposób w określonych miejscach jest niemożliwa w bakteriach.

Przeanalizujemy także strukturę nukleosomów z przyłączoną zmodyfikowaną domeną GH1, tak aby stwierdzić jak modyfikacje potranslacyjne zmieniają ułożenie przestrzenne domeny GH1 na nukleosomie. Użyjemy mikroskopii elektronowej i niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego.