

Ludzkie ciało składa się z ponad dwustu różnych tkanek. Praktycznie wszystkie nasze komórki mają ten sam genom i jednym z największych pytań we współczesnej biologii jest to, jak owa zdumiewająca złożoność komórkowa jest generowana podczas rozwoju i następnie utrzymywana w dorosłym życiu. Na poziomie molekularnym, tożsamość każdej komórki jest definiowana przez zestaw genów które są w niej aktywne. Owocuje to ekspresja ściśle określonego zbioru białek, które spełniają konkretną grupę zadań, takich jak na przykład odpowiedź immunologiczna w komórkach T lub B lub transdukcja sygnału elektrochemicznego w neuronach. Ekspresja niewłaściwego zestawu genów może mieć katastrofalne konsekwencje dla poszczególnych komórek, tkanek a nawet całego organizmu. Na przykład, brak ekspresji pojedynczego białka może zaburzać tworzenie komórek odpornościowych, a tym samym zaburzyć obronę przed patogenami; tworzenie podniebienia w czasie rozwoju embrionalnego może być zakłócone przez zmniejszoną ekspresję kluczowego morfogenu. Podobnie niewłaściwa aktywność genomu może prowadzić do raka. Odkrycie mechanizmów kontrolujących ekspresję genów stanowi zatem klucz do zrozumienia molekularnych podstaw tożsamości komórki.

Elementy regulatorowe DNA (ERD) to grupa sekwencji w genomie współpraca których określa poziom aktywności genów. ERD obejmują: promotory – sekwencje DNA w sąsiedztwie początku genu, które umożliwiają jego ekspresję; enhancery (pol.: wzmacniacze) – ERD, które aktywują promotory, częstokroć pomimo znaczących odległości genomowych separujących je od promotorów; silencery (pol.: tłumiki) – ERD, które redukują aktywność promotorów; i insulatory (pol.: izolatory) - sekwencje DNA, które koordynują interakcje pomiędzy promotorami i enhancerami.

Dane zgromadzone na przestrzeni ostatnich lat wskazują że dialog pomiędzy ERD częstokroć opiera się na tworzeniu bezpośrednich fizycznych kontaktów pomiędzy nimi. Ponieważ, jak widzieliśmy wcześniej, ERD są często oddzielone od siebie długimi odcinkami DNA, genomy muszą przyjmować określoną strukturę trójwymiarową, która sprzyjała będzie wydajnym jak i specyficznym tworzeniu się kontaktów pomiędzy ERD.

Hi-C to technologia badania struktury chromatyny, która opiera się na wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu DNA. Hi-C umożliwia określanie sposobu uporządkowania DNA w jądrze, odpowiednio przygotowanych zakonserwowanych komórek. Dane Hi-C ujawniły podział genomów ssaków na domeny kontaktów które zostały określone mianem domen topologicznych (DT). Granice owych domen działają jak silne izolatory, które fizycznie blokują interakcje pomiędzy sekwencjami znajdującymi się w sąsiednich DT. Obecne modele zakładają że DT stanowią funkcjonalne jednostki aktywności genomów określające które kontakty pomiędzy ERD są 'dozwolone'. Genetyczne usunięcie granic DT może prowadzić do stanów patologicznych wynikających z deregulacji ekspresji genów. Co ciekawe, granice DT często oddziałują ze sobą tworząc struktury przypominające pętle. CTCF, to wielozadaniowe białko wiążące się z DNA. CTCF leży u podstaw tworzenia granic DT i pętli. Usunięcie tego białka powoduje demontaż obu struktur a w konsekwencji utratę aktywności insulatorów w genomie. Mechanizmy dzięki którym CTCF wypełniania te zadania nie są jasne a ich poznanie będzie miało fundamentalne znaczenie dla biologii molekularnej i rozwojowej.

Wcześniejsze badania wykazały, iż genomowe współrzędne granic DT i pętli są nadzwyczaj dobrze zachowane podczas rozwoju ssaków. Niedawno, równoległe z dwiema innymi grupami, odkryliśmy, że DT i pętle ulegają globalnemu wzmocnieniu podczas najwcześniejszych etapów rozwoju zarodka. Pokazaliśmy, że tworzenie się dojrzałej topologii genomu podczas rozwoju zbiega się z nieodwracalną utratą plastyczności komórek, mająca miejsce w chwili, kiedy embrionalne komórki macierzyste różnicują się do jednej z trzech głównych warstw zarodkowych. Nasze wyniki sugerują więc generalną modyfikację funkcji czynnika CTCF w rozwoju. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw wyżej wymienionych zjawisk są obecnie nieznane. Nie wiemy również, w jaki sposób owa konsolidacja genomu opisana na podstawie danych Hi-C, przekłada się na dynamikę tworzenia się pętli w czasie rzeczywistym, w żywych komórkach. Niniejszy projekt badawczy ma na celu udzielenie odpowiedzi na te dwa pytania. Zidentyfikujemy czynniki wiążące się z CTCF w trakcie rozwoju komórek embrionalnych co da nam listę białek zaangażowanych w regulację funkcji CTCF. Następnie, używając wysokoprzepustowych technologii sekwencjonowania, określimy w jaki sposób najciekawsze zidentyfikowane przez nas białka wpływają na biologię CTCF w rozwoju. Wykorzystamy technologię edycji genomu CRISPR-Cas9, aby usunąć odkryte przez nas czynniki regulujące CTCF. Określimy jakie konsekwencje dla siły granic DT i pętli ma brak owych białek. W równoległej osi badawczej wykorzystamy innowacyjne techniki mikroskopii, aby zmierzyć czasowo-przestrzenną dynamikę kontaktów pomiędzy ERD w embrionalnych komórkach macierzystych i w ich zróżnicowanym potomstwie. Nasze wyniki pozwolą lepiej zrozumieć, w jaki sposób trójwymiarowa struktura genomu i ekspresja genów są regulowane podczas rozwoju.