

Vicia faba subsp. *minor* (bobik) jest jedną z najwcześniej "udomowionych" i wykorzystywanych przez ludzi roślin. Także obecnie jest szeroko stosowany jako składnik kulinarny wielu kuchni świata, roślina pastewna dla rolnictwa, a L-DOPA (prekursor dopaminy, aminokwas pozyskiwany z bobiku), jest skutecznie wykorzystywany w leczeniu choroby Parkinsona. Roślina ta jest bardzo ceniona, zarówno ze względu na jej wysoce odżywczy skład, jak i zdolność do wzrostu w niesprzyjających warunkach środowiskowych (wliczając w to niewystarczające nawodnienie, zwiększone zasolenie czy inne potencjalnie szkodliwe czynniki chemiczne obecne w glebie).

Badania prowadzone na modelu intensywnie dzielących się, merystematycznych komórek korzeni bobiku wykazały, że posiadają one niezwykle dużą zdolność do przeżycia, nawet w ekstremalnych warunkach (mechanizmy odpowiedzialne za tą niezwykle wysoką przeżywalność nie zostały jeszcze poznane).

W komórkach *V. faba* poddanych działaniu stresu replikacyjnego, inicjowanego hydroksymocznikiem (HU), oraz indukcji przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC), wywoływanej wpływem kofeiny (CF), zaobserwowano populację chromosomów mitotycznych typu-PCC wykazujących silną pulweryzację, a jednocześnie - zachowujących kompetencję do replikacji DNA w mitozie. Badane komórki merystemu korzenia były w stanie przetrwać indukcję PCC - i w pełni zregenerować się - już w ciągu 12 godzin po przeniesieniu ich do wody (cały cykl komórkowy bobiku 'zamyka się' w 24 godzinach). Z naszych dotychczasowych badań wynika, że za taki stan rzeczy odpowiada między innymi ewolucyjnie "przygotowanie" rośliny do skutecznej i możliwie szybkiej replikacji DNA, a także posiadanie przez nią niezwykle efektywnych mechanizmów naprawy DNA.

Głównym celem tego projektu jest zbadanie mechanizmu odpowiedzialnego za zdolności adaptacyjne *V. faba*, w tym ochronę przed negatywnymi skutkami środowiska. Dlatego planowane jest zaimplementowanie wysoce precyzyjnych metod obrazowania dynamiki replikacji oraz zmian obserwowanych na poziomie chromatyny.

W pierwszym etapie badań doprecyzowany zostanie wpływ stresu replikacyjnego oraz indukcji PCC na zachowanie się postępujących widełek replikacyjnych i ewentualne zaangażowanie zapasowych miejsc startu replikacji. Wykonane zostanie podwójne, immunocytochemiczne znakowanie nici DNA markerami replikacji (m.in. CldU, IdU), także w połączeniu z opracowanym przez nasz zespół protokołem grzebieni molekularnych. Przeprowadzone zostanie również (we współpracy z naszym naukowym partnerem z Wielkiej Brytanii) modelowanie matematyczne przebiegu replikacji DNA i re-startu replikacji podczas indukcji PCC. Wyniki przeprowadzonych badań umożliwią lepsze poznanie dynamiki replikacji oraz odpowiedzi na jej zaburzenia nie tylko u roślin, ale również - ze względu na analogie w organizacji procesu powielania DNA - u wszystkich organizmów eukariotycznych posiadających duży, mierzony w Gb, genom (w tym także u ludzi).

W kolejnym etapie realizacji projektu badaniom poddana zostanie struktura chromatyny, ze szczególnym uwzględnieniem regionów heterochromatynowych (ze względu na to, że poprzez inhibicyjny wpływ HU regiony heterochromatyny są najbardziej narażone na występowanie uszkodzeń, powstałych w wyniku niedoreplikowań). Zaplanowano ustalenie lokalizacji i ilościowego zaangażowania heterochromatynowego białka HP1 (α , β i γ) w komórkach 'przed' oraz 'po' działaniu hydroksymocznika, jak również podczas indukcji PCC. Z kolei, przeprowadzenie porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) pozwoli na zweryfikowanie jaki jest wpływ hydroksymocznika oraz kofeiny, na strukturę heterochromatyny.

Zaplanowano także zbadanie, czy przedłużenie czasu zatrzymania widełek replikacyjnych nie zwiększa prawdopodobieństwa błędnej re-asocjacji histonów rdzeniowych na DNA. W tym celu wykonamy immunoprecypitację chromatyny (ChIP) dla białek CAF1A i wybranych składowych kompleksu MCM2-7 (np. MCM2). CAF1A to białko montażowe dla histonów na nici DNA. Białka MCM2-7 to rodzina sześciu pokrewnych białek niezbędnych do inicjowania i wydłużania replikacji DNA.

W ostatnim etapie badań planowane jest modelowanie całości zachodzących zdarzeń, między innymi w formie wizualizacji na poziomie 3D przeprowadzonej z wykorzystaniem specjalistycznych programów graficznych (to specjalność kierownika projektu).

Wyniki zaplanowanych badań pomogą nam potwierdzić (lub zaprzeczyć) postawioną hipotezę – uważamy, że zdolności adaptacyjne *V. faba* mogą wynikać między innymi z jej zdolności do nieznacznej reorganizacji struktury chromatyny, szczególnie w regionie heterochromatyny fakultatywnej. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zdolności przetrwania badanej przez nas rośliny oraz efektów ich działania może mieć ogromne znaczenie dla hodowców, w szczególności przy opracowywaniu nowych odmian przeznaczonych do wzrostu w regionach bardzo niekorzystnych dla upraw.

Zdolność roślin do wzrostu w niesprzyjającym środowisku - w szczególności w kontekście coraz bardziej zauważalnych zmian klimatycznych i zanieczyszczenia Ziemi, naszej planety - jest czynnikiem, który może stać się niebawem celem modyfikacji hodowlanych dotyczących większości roślin rolniczo-użytecznych.