

Warszawa, 27.02.2016

### **Oferta tematyki badań**

Imię i nazwisko: dr hab. Marta Koblowska, prof UW  
Miejsce pracy: Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
Adres: Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa  
Adres e-mail: marta@ibb.waw.pl

Imię nazwisko: prof. Jerzy Tiuryn  
Miejsce pracy: Wydział Matematyki, Informatyki i Mechaniki, Uniwersytet Warszawski  
Adres: Banacha 2, 02-097 Warszawa  
Adres e-mail: tiuryn@mimuw.edu.pl

*Konieczne jest uzyskanie przez kandydata zgody opiekunów przed rozmową kwalifikacyjną*

### **Rola struktury chromatyny w regulacji ekspresji genów *Arabidopsis thaliana***

Regulacja ekspresji genów eukariotycznych zależy nie tylko od działania czynników transkrypcyjnych, które wiążą się do specyficznych miejsc w DNA, ale także od białek tworzących wraz z DNA nukleoproteinowy kompleks - chromatynę. Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom, kompleks złożony z DNA owiniętego wokół białkowego rdzenia, w skład którego wchodzi osiem cząsteczek histonów rdzeniowych. O strukturze nukleosomów, ich lokalizacji w chromatynie, a tym samym budowie poszczególnych regionów chromatynowych, decyduje współdziałanie wielu elementów, takich jak histony łącznikowe, stopień i rozmieszczenie metylacji DNA i potranslacyjnych modyfikacji histonów rdzeniowych, czy też działanie wielo-podjednostkowych kompleksów białkowych przebudowujących chromatynę z udziałem energii dostarczanej przez ATP. Struktura przestrzenna chromatyny, determinowana przez rozmieszczenie w niej i postać nukleosomów (rodzaj wariantów histonów rdzeniowych, ich modyfikacji, a także modyfikacji DNA), ma kluczowe znaczenie dla wiązania się białkowych czynników regulatorowych i, w konsekwencji, dla kontroli i regulacji wszystkich zachodzących w jądrze komórki eukariotycznej procesów związanych z DNA. W odpowiedzi na zmiany zewnętrznego środowiska komórki, a także na sygnały wewnątrzkomórkowe struktura chromatyny ulega zmianom, co odzwierciedla się w zmianach profilu transkrypcyjnego komórki oraz w sposobie składania transkryptów.

W naszym Zespole zajmujemy się badaniem związków i zależności między konkretnymi modyfikacjami chromatyny i lokalizacją białek regulatorowych, a zmianami ilościowymi i jakościowymi transkryptomu modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na działanie

czynników hormonalnych oraz stresów środowiskowych. W tym celu stosujemy genomyczne techniki wielko-skalowe, jak mikromacierze DNA oraz sekwencjonowanie nowej generacji. Wykorzystując to nowoczesne podejście staramy się nie tylko ustalić funkcje badanych przez nas klasycznych elementów strukturalnych chromatyny, ale także zidentyfikować nieznanne dotąd czynniki mające podobnie kluczowy udział w regulacji ekspresji genów. System tej regulacji jest wieloskładnikowy i ma charakter niezwykle złożonej sieci interakcyjnej. Ze względu na to, a także na złożoność informacyjną danych uzyskiwanych dzięki technikom genomycznym, analiza tych ostatnich jest dalece nietrywialna i wymaga ścisłej interdyscyplinarnej współpracy i jednoczesnego zaangażowania zespołów biologów oraz informatyków.

**Podstawowym celem planowanej pracy doktorskiej będzie opracowanie metod bioinformatycznych i statystycznych, które posłużą do analizy oraz biologicznej interpretacji danych wielko-skalowych, w celu precyzyjnego opisanie zależności między strukturą chromatyny a regulacją ekspresji genów w modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*.**

**Szczegółowe cele badawcze:**

**1) Poznanie genów bezpośrednio i specyficznie regulowanych przez kompleks przebudowujący chromatynę SWI/SNF, w odpowiedzi na działania wybranych hormonów roślinnych. Identyfikacja wśród nich genów kluczowych (tzw. "hub genes") dla zależnej od kompleksu SWI/SNF koordynacji odpowiedzi fizjologicznej na różne hormony.**

Nasze wyniki wstępne oraz dane innych zespołów badawczych wskazują, że kompleks SWI/SNF remodelujący chromatynę podczas wczesnego rozwoju rośliny jest kluczowy dla integracji sygnałów (tzw. „cross-talk”) przekazywanych przez szlaki sygnałowe różnych hormonów roślinnych. W celu ustalenia funkcji SWI/SNF w cross-talk'u hormonalnym, oprócz badań na poziomie fizjologicznym oraz genetycznym zostaną przeprowadzone analizy na poziomie genomowym. Z użyciem mikromacierzy DNA wykonane zostaną analizy transkryptomyczne siewek typu dzikiego oraz mutantów w genie *brm* kodującym enzymatyczną podjednostkę kompleksu SWI/SNF, ATPazę BRM, w warunkach kontrolnych oraz w roślinach traktowanych hormonami. Za pomocą immunoprecypitacji chromatyny i sekwencjonowania wysokoprzepustowego (ChiP-seq), w tych samych warunkach eksperymentalnych zostaną określone miejsca wiązania w genomie *Arabidopsis* białka BRM. Zestawienie danych uzyskanych z obu typów doświadczeń pozwoli na identyfikację genów bezpośrednio i specyficznie regulowanych przez ATPazę BRM.

Dla wybranych hormonów zostaną przeprowadzone doświadczenia typu "time course analysis", na siewkach typu dzikiego oraz mutantach w genie *brm*, z zastosowaniem mikromacierzy DNA, w celu umożliwienia analizy dynamiki sieci genowych, i wytypowania w nich potencjalnych kluczowych integratorów ścieżek hormonalnych, zależnych od działania kompleksu SWI/SNF.

## **Metody badawcze**

Porównawcza analiza transkryptomu rośliny dzikiej i mutantu *brm* w warunkach kontrolnych i pod wpływem działania hormonów roślinnych z zastosowaniem mikromacierzy DNA umożliwi identyfikację genów regulowanych przez kompleks przebudowujący chromatynę SWI/SNF w odpowiedzi na działanie wybranych hormonów. Na wstępie wykonana będzie analiza jakościowa danych uzyskanych z mikromacierzy, która oceni powtarzalność profilu ekspresji genów wewnątrz poszczególnych wariantów biologicznych oraz wskaże ogólne różnice w ekspresji pomiędzy porównywanymi wariantami. Analiza jakościowa zostanie wykonana z użyciem analizy głównych składowych (ang. Principal Component Analysis – PCA). Z kolei zastosowanie analizy wariancji (ANOVA) pozwoli na wyznaczenie genów o statystycznie istotnie zmienionym poziomie ekspresji (ang. fold change) pomiędzy porównywanymi próbkami. W tych samych warunkach eksperymentalnych, w których zidentyfikowane będą geny o zmienionej ekspresji wyznaczona zostanie lokalizacja kompleksu SWI/SNF w chromatynie. Wykorzystanie odpowiednich narzędzi bioinformatycznych służących do mapowania odczytów na sekwencję genomową *Arabidopsis* oraz metody "peak calling" pozwoli na wyznaczenie miejsc lokalizacji analizowanego kompleksu w genomie. Zestawienie miejsc lokalizacji SWI/SNF z genami o zmienionej ekspresji w ustalonych warunkach eksperymentalnych pozwoli na wykrycie genów bezpośrednio regulowanych przez kompleks remodelujący chromatynę zależnie od działania zastosowanych hormonów roślinnych.

Do analizy dynamiki sieci genowych oraz identyfikacji genów kluczowych dla integracji ścieżek hormonalnych *Arabidopsis* zostanie wykorzystane oprogramowanie BNFinder opracowane oraz udoskonalone na Wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki UW (Wilczyński B. et al. 2009; Dojer N. et al 2013).

## **2) Ustalenie roli potencjalnego kompleksu białkowego wiążącego się do fosfo-acetylowanego histonu H3 (S10phK14AcH3) *Arabidopsis thaliana* w regulacji procesu składania genów (splicing) u roślin - poznanie genów, których splicing podlega regulacji przez nowo zidentyfikowany kompleks białkowy.**

Otrzymane przez nasz zespół wyniki wskazują na prawdopodobną rolę fosfo-acetylacji (fosforylacja seryny 10 i jednoczesna acetylacja lizyny 14) histonu H3 w regulacji procesu dojrzewania mRNA u *Arabidopsis*. Wykorzystując zestaw odpowiednio modyfikowanych peptydów o sekwencji identycznej z fragmentem tzw. ogona histonu H3, technikę powinowactwa do peptydu (ang. peptide pull down) oraz metody spektrometrii mas, zidentyfikowaliśmy zestaw kilkunastu białek, które specyficznie wiązały się do złoza zawierającego fosfo-acetylowany (S10ph-K14Ac) peptyd H3. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne wskazały z dużym prawdopodobieństwem, że część z wykrytych białek to składniki wielo-podjednostkowego kompleksu białkowego. Dane literaturowe oraz wykonane dotąd przez nasz zespół drożdżowe testy dwuhybrydowe potwierdziły oddziaływania dla 6 spośród kilkunastu zidentyfikowanych białek. Funkcja większości "znalezionych" białek jest związana z regulacją

splicing. Obecnie charakteryzowane są mutanty *Arabidopsis* w genach kodujących trzy spośród sześciu zidentyfikowanych białek nowego kompleksu.

Jak dotąd nieznanne są geny, których splicing mógłby być regulowany przez zidentyfikowane białka. W związku z tym planowana jest jakościowa analiza pełnego zestawu transkryptów z zastosowaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania (RNA-seq) w roślinach typu dzikiego oraz w scharakteryzowanych mutantach. Pozwoli to na identyfikację genów, których transkrypty są różnie składane w badanych mutantach. Dodatkowo, wykorzystując immunoprecypitację chromatyny i sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (ChiP-seq), zostaną określone miejsca wiązania w genomie *Arabidopsis* dwóch białek kompleksu. Zestawienie danych uzyskanych z obu typów doświadczeń pozwoli na identyfikację genów bezpośrednio i specyficznie regulowanych przez badane czynniki białkowe.

### **Metody badawcze**

Analiza RNA-seq oraz zastosowanie właściwych narzędzi bioinformatycznych pozwoli na wykrycie genów, których transkrypty są różnie składane w mutantach *Arabidopsis* z wyłączoną ekspresją genów kodujących trzy spośród sześciu zidentyfikowanych białek nowego kompleksu potencjalnie zaangażowanego w regulację procesu alternatywnego splicingu w porównaniu do roślin dzikich. W celu identyfikacji alternatywnie składanych genów na wstępie zostanie zastosowane oprogramowanie TopHat, które umożliwi identyfikację miejsc łączących sąsiadujące egzony (ang. exon-exon splice junctions). Następnie narzędzie JuncBASE (Brooks AN et al. 2011) posłuży do identyfikacji zdarzeń alternatywnego splicingu (AS) takich jak zachowanie intronu lub wycięcie egzonu, alternatywne miejsce splicingowe 5' lub 3', alternatywne miejsce inicjacji transkrypcji (alternatywny egzon pierwszy) czy alternatywne miejsce poliadenylacji (alternatywny egzon terminalny).

Do identyfikacji miejsc wiązania białek badanego kompleksu zostaną wykorzystane takie same narzędzia, jak zastosowane do ustalenia lokalizacji kompleksu SWI/SNF (opisane w punkcie poprzednim).

Zestawienie wyników z obu typów doświadczeń pozwoli na identyfikację genów bezpośrednio i specyficznie regulowanych przez nowo odkryty kompleks białkowy.

### **3) Zastosowanie ilościowej analizy transkryptomów do ustalenia biologicznego roli konserwowanego ewolucyjnie wariantu histonu łącznikowego w adaptacji roślin do stresu środowiskowego.**

Rośliny, jako organizmy osiadłe, aby przetrwać w zmiennych warunkach zewnętrznych, musiały wytworzyć złożony system adaptacji do stresów środowiskowych, w szczególności ograniczonej dostępności wody i światła, stanowiących główne zasoby dla fotosyntezy. W naszej Pracowni udokumentowaliśmy, że w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* kluczową rolę w inicjacji procesów adaptacyjnych pełni indukcja jednego z ewolucyjnie konserwowanych wariantów histonów

łącznikowych, określanego jako H1.3 (Rutowicz et al. 2015). Dotychczas wykonane przez nas analizy zmian na poziomie struktury chromatyny oraz mapowanie pozycji w genomie różnych modyfikacji epigenetycznych można tłumaczyć za pomocą modelu zakładającego, że H1.3 działa podobnie jak zwierzęce pionierskie czynniki transkrypcyjne, powodując otwieranie zamkniętych przedtem rejonów skondensowanej chromatyny dla innych czynników transkrypcyjnych. Dla weryfikacji tej hipotezy niezbędne jest porównanie ilościowego profilu transkrypcji indukowanej w różnych typach komórek w wyniku zadziałania stresu, dla roślin dzikich i mutantów w genie *H1.3*. W tym celu wykorzystamy stosowaną dotychczas w naszej Pracowni do celów charakterystyki jakościowej, zaawansowaną technologię sekwencjonowania transkryptów (RNA-seq) do analizy ilościowej.

### **Metody badawcze**

Kwantyfikacja transkryptów za pomocą danych z analizy RNA-seq, mimo dostępności szeregu programów komputerowych i algorytmów, jest dalece nietrywialna i wymaga zaawansowanej i złożonej analizy informatycznej oraz opracowania nowych narzędzi analitycznych. Dotyczy to w szczególności porównywania danych ilościowych uzyskanych z analiz niewielkich ilości materiału pochodzącego z różnych typów komórek (w wypadku tego projektu będą to: komórki aparatów szparkowych, komórki tkanki miękkiszowej liścia i komórki inicjalne zawiązków korzeni bocznych).

Wiarygodna ilościowa charakterystyka zmian transkryptomicznych dla opisanych wyżej modeli doświadczalnych pozwoli na wyciągnięcie daleko głębszych wniosków niż było to dotychczas możliwe, o mechanizmie biologicznym leżącym u podłoża adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych.

7. Przewidywany całkowity koszt realizacji projektu :

(bez kosztów stypendium doktoranckiego) **250 000 zł**

Projekt finansowany z grantu pt.: " Ustalenie roli kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF w "crosstalk`u" hormonalnym podczas wczesnego rozwoju Arabidopsis UMO-2014/13/B/NZ1/00967

### **Kierownik Projektu**

prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski (zgoda na finansowanie projektu z wymienionego wyżej grantu)

### **Referencje:**

1. Rutowicz K, Puzio M, Halibart-Puzio J, Lirski M, Kroteń MA, Kotliński M, Knížewski Ł, Lange B, Muszewska A, Śniegowska-Świerk K, Kościelniak J, Iwanicka-Nowicka R, Żmuda K, Buza K, Janowiak F, Jõesaar I, Laskowska-Kaszub K, Fogtman A, Zielenkiewicz P, Tiuryn J, Kollist H, Siedlecki P, Ginalski K, Świeżewski S, Koblowska M, Archacki R, Wilczyński B, Rapacz M, Jerzmanowski A (2015). A specialized histone H1 variant is required for adaptive responses to complex abiotic stress and related DNA methylation in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 2015 Sep 8. pii: pp.00493.2015
2. Archacki R., Buszewicz D., Sarnowski T.J., Sarnowska E., Rolicka A.T., Tohge T., Fernie A.R., Jikumaru Y., Kotlinski M., Iwanicka-Nowicka R., Kalisiak K., Patryn J., Halibart-Puzio J., Kamiya Y., Davis S.J., Koblowska M.K., Jerzmanowski A. (2013) BRAHMA ATPase of the SWI/SNF chromatin remodeling complex acts as a positive regulator of gibberellin-mediated responses in Arabidopsis. **PLoS One** 8(3),.
3. Archacki R., Sarnowski T., Puzio J., Brzeska, K., Prymakowska-Bosak, M., Koncz, C. and Jerzmanowski, A. (2009) Genetic analysis of functional redundancy of BRM ATPase and ATSWI3C subunits of Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodelling complexes. **Planta**, 229, 1281-1292.
4. Jerzmanowski, A. (2007) SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. **Biochim. Biophys. Acta** 1769, 330-345.
5. Knížewski L., Ginalski, K. and Jerzmanowski A. (2008) Snf2 proteins in plants: gene silencing and beyond. **Trends in Plant Science** 13, 557-565.
6. Sokół A, Kwiatkowska A, Jerzmanowski A, Prymakowska-Bosak M ( 2007) Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. **Planta** 227:245-254.
7. Brooks AN, Yang L, Duff MO, Hansen KD, Park JW, Dudoit S, Brenner SE, and Graveley BR. (2011) Conservation of an RNA Regulatory Map between Drosophila and Mammals. **Genome Research** 21:193-202
8. Wilczyński B, Dojer N. **BNFinder**: exact and efficient method for learning Bayesian networks. (2009) **Bioinformatics**. Jan 15;25(2):286-7.
9. Dojer N, Bednarz P, Podsiadlo A, Wilczynski B. **BNFinder2**: Faster Bayesian network learning and Bayesian classification. 2013 **Bioinformatics**. Aug 15;29(16):2068-70