

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Alicja Tomasiak

PRACA DOKTORSKA

Kompleksowa analiza epigenetyczna procesów reprogramowania komórkowego w tkankach hodowanych *in vitro* oraz *in vivo*- badania porównawcze gatunków *Fagopyrum*

STRESZCZENIE

Pierwszy etap pracy doktorskiej dotyczył badań nad procesami różnicowania komórek kalusa embriogenego (EK) *F. esculentum* oraz kalusa morfogenego (MK) i niemorfogenego (NK) *F. tataricum* w wybranych dniach kultury. EK i MK indukowano z niedojrzałych zarodków zygocycznych. EK *F. esculentum* charakteryzuje się budową typową dla embriogenicznej tkanki kalusowej. Składa się z mas embriogenicznych i komórek parenchymatycznych, zachowuje stabilność przez okres do dwóch lat hodowli, a jego morfologia charakteryzuje się gęstą, kulistą strukturą. MK *F. tataricum* charakteryzuje się zdolnością do morfogenezy lub embriogenezy somatycznej przez około 10 lat hodowli, wykazując wysoki poziom stabilności genomu. NK pojawia się na powierzchni MK po około dwóch latach hodowli w wyniku endoreplikacji. Charakteryzuje się aneuploidią, szybkim tempem wzrostu, wysokim poziomem stresu oksydacyjnego oraz całkowitą utratą zdolności do morfogenezy.

Celem pracy w pierwszym etapie było określenie zmian w poziomie występowania wybranych markerów epigenetycznych dotyczących poziomu metylacji DNA oraz metylacji i acetylacji histonów podczas odróżnicowania i ponownego różnicowania komórek wyżej wymienionych typów kalusów w wybranych dniach pasażu. Wykazano, że: obniżony poziom H3K4me2 jest skorelowany z odróżnicowaniem komórek u EK *F. esculentum* i MK *F. tataricum*; natomiast obniżony poziom metylacji DNA jest najprawdopodobniej powiązany z nabyciem potencjału embriogenego i ponowną inicjacją proembriogenicznych kompleksów komórkowych w MK *F. tataricum*. Spośród wszystkich badanych modyfikacji acetylacja histonów, czyli modyfikacje H4K16ac i H4K5ac, wykazały największą zmienność w NK, co

można odnieść do procesów endoreduplikacji, charakterystycznych dla rozwoju tego typu kalusa.

Dodatkowo, otrzymane wyniki pozwoliły na wybór jednej modyfikacji epigenetycznej (H3K4me3), którą użyto do badań immunoprecypitacji chromatyny. Celem badań była analiza i porównanie poziomu ekspresji genów i poziomu H3K4me3 w genach ściany komórkowej pomiędzy MK i NK *F. tataricum*. Analizy bioinformatyczne sekwencjonowania DNA tkanek poddanych immunoprecypitacji chromatyny wykazały, że genomowa zawartość H3K4me3 jest większa w NK. Natomiast w genach kodujących konkretne enzymy odpowiadające za reorganizację składników ściany komórkowej, tj. metyloesterazy pektynowe oraz peroksydazy, NK charakteryzował się obniżonym poziomem H3K4me3, co powiązano z brakiem zdolności do morfogenezy komórek tego typu kalusa. W MK w badanych genach ściany komórkowej poziom H3K4me3 wzrastał wraz z progresją pasażu, co może oznaczać wzmożoną aktywność enzymów zaangażowanych w przemiany składników ściany komórkowej podczas procesów odróżnicowania komórkowego i dezintegracji proembriogennych kompleksów komórkowych. Wysunięto wniosek, że modyfikacja H3K4me3 odgrywa kluczową rolę w aktywacji genów zaangażowanych w biosyntezę i reorganizację ściany komórkowej.

W drugiej części projektu przeprowadzono analizy poziomu metylacji DNA podczas rozwoju kwiatów *in vivo*. Poziom metylacji badano w elementach (płatkach, nektarniki, załąźnie, znamiona słupka) kwiatów zamkniętych i otwartych obcopolnego gatunku *F. esculentum* cechującego się heterostylią (kwiaty typu Pin i Thrum) i samopylnego gatunku *F. tataricum*. W porównaniu do kwiatów zamkniętych, w otwartych kwiatach zaobserwowano spadek metylacji DNA w znamionach słupka, płatkach i załązniach (z wyjątkiem załązni w typie Thrum). Stwierdzono również znaczące różnice w poziomach metylacji DNA między morfotypami Pin i Thrum, jak i w kwiatach *F. tataricum*. Wykazano również, że spadek metylacji DNA korelował z obniżoną ekspresją genów kodujących metylotransferazy DNA. W otwartych kwiatach Thrum ekspresja *MET1* była ponad 45 razy niższa niż w zamkniętych, natomiast w zamkniętych i otwartych kwiatach Pin zmiana w poziomie ekspresji *MET1* była nieistotna statystycznie. Obserwowano również obniżoną transkrypcję innych analizowanych genów (*CMET3*, *DME1*, *DME3*, *ROS1*) w otwartych kwiatach Pin. Ponadto, gen *ROS1*, kodujący demetylazę DNA, wykazywał obniżoną ekspresję w otwartych kwiatach *F. esculentum* i *F. tataricum*. Ponieważ niedostępne są dane literaturowe na temat zmian epigenetycznych podczas rozwoju kwiatów gatunków *Fagopyrum* można zakładać, że wyższy poziom metylacji DNA oraz poziom ekspresji genów kodujących metylotransferazy i

demetylasy DNA w zamkniętych kwiatach obu gatunków *Fagopyrum* wskazuje, że metylacja jest zaangażowana procesy towarzyszące ich rozwojowi.

Słowa kluczowe: *Fagopyrum*, epigenetyka, heterostylia, H3K4me3, immunoprecypitacja chromatyny, kalus, kwiaty, metylacja DNA, odróżnicowanie, różnicowanie