

Streszczenie

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy dotyczą procesu somatycznej embriogenezy (SE), podczas którego somatyczne komórki roślinne w warunkach kultury *in vitro* zmieniają program rozwojowy na embriogeniczny i formują struktury zarodkopodobne, regenerujące w kompletne rośliny. Zjawisko SE manifestuje zdolność komórek roślinnych do toti-/pluripotencji i stanowi model w badaniach nad poznaniem molekularnych uwarunkowań plastyczności rozwojowej komórek u roślin.

Badania nad molekularnymi uwarunkowaniami SE u modelowego w genomice roślin gatunku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. doprowadziły do zidentyfikowania szeregu genów, w tym kodujących czynniki transkrypcyjne (TF), o centralnej roli w tranzycji embriogenicznej komórek. Znacznie mniej wiadomo o tym, w jaki sposób w odpowiedzi na warunki indukujące proces SE, najczęściej auksynę, geny te są kontrolowane przez modyfikacje epigenetyczne, w tym acetylację histonów (Hac). Wykazano, że traktowanie eksplantatów trichostatyną A (TSA), inhibitorem deacetylaz histonów (HDAC) skutkuje aktywacją embriogenicznego szlaku rozwojowego w kulturze *in vitro* *Arabidopsis*. Stąd też badania prowadzone w ramach prezentowanej pracy doktorskiej miały na celu przybliżenie funkcji Hac w indukcji SE, ze szczególnym uwzględnieniem roli Hac w regulacji genów TFs o podstawowej funkcji w indukcji embriogenicznej (tzw. SE-TFs), w tym genów *LEC1* i *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 1; 2*), *FUS3* (*FUSCA 3*), *BBM* (*BABY BOOM*), *WUS* (*WUSCHEL*), *AGL15* (*AGAMOUS-LIKE 15*) i *MYB118* (*MYB DOMAIN PROTEIN 118*). Badano także udział Hac w mechanizmie regulacji przez SE-TFs, w tym *AGL15* i *AP2* (*APETALA 2*), genów docelowych podczas SE.

W celu indukcji SE jako eksplantaty wykorzystano niedojrzałe zarodki zygotyczne *Arabidopsis*, które indukowano na dwóch pożywkach EA i ET suplementowanych odpowiednio syntetyczną auksyną, 2,4-D (5 μ M) lub TSA (1 μ M). Kulturę kontrolną stanowiły eksplantaty rozwijające się w siewki na pożywce E0 pozbawionej induktorów SE. W badaniach wykorzystano różne genotypy *Arabidopsis*, w tym mutanty i linie transgeniczne. W pracy zastosowano szereg metod badawczych z obszaru genomiki funkcjonalnej roślin, w tym technikę ELISA, analizę immunohistochemiczną, ChIP-qPCR oraz analizy poziomu ekspresji genów (RNA-seq oraz RT-qPCR). Analizy Hac dotyczyły lizyny w pozycjach H3K9/K14ac oraz H4K5/K8/K12/K16ac i prowadzone były na dwóch poziomach – globalnym oraz genowo-specyficznym.

Analizy techniką ELISA i immunohistochemiczne wykazały, że podczas indukcji SE zachodzą czasowo-przestrzenne zmiany w poziomie i wzorze sygnałów Hac w eksplantatach, jednakże zmiany te nie są specyficzne dla obszarów eksplantatów zaangażowanych w formowanie zarodków somatycznych, SAM i liścieni. Postawiono hipotezę, że to raczej nie globalne, a genowo-specyficzne modyfikacje chromatyny zachodzące w nielicznych, embriogenicznie odpowiadających na indukcję SE komórkach eksplantatu mają znaczenie w Hac-zależnym mechanizmie indukcji SE. Potwierdzeniem roli Hac w epigenetycznej kontroli genów SE-*TFs* było wykazanie wzrostu poziomu Hac w chromatynie związanej z genami *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* i *MYB118* w kulturze ET. Wzrostowi Hac towarzyszyła zwiększona aktywność transkrypcyjna tych genów. Sugeruje to, że w TSA-zależnej SE Hac kontroluje transkrypcję SE-*TFs* poprzez modyfikacje chromatyny związanej z TSS+300 pz fragmentem genów. W kulturze EA zwiększonej aktywności transkrypcyjnej SE-*TFs* nie towarzyszyły istotne zmiany w poziomie Hac w badanym rejonie chromatyny, co jednak nie wyklucza, że auksyna mogła indukować zmiany w poziomie Hac w innym niż badany rejonie chromatyny lub/i w innych niż analizowane (H3K9/K14ac; H4K5/K8/K12/K16ac) pozycjach lizyny.

W pracy wykazano, że indukcji SE towarzyszy zróżnicowana ekspresja 9 genów *HAT* (*HAG1/GCN5*, *HAG2*, *HAG3*, *HAG4*, *HAG5*, *HAC2*, *HAC4*, *HAC5* i *HAF2*) oraz 12 genów *HDAC* (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA15*, *HDA18*, *HDA19*, *HDT1*, *HDT2*, *HDT3*, *HDT4* i *SRT1*). Zaangażowanie HAT i HDAC w SE potwierdziły także analizy aktywności enzymatycznej tych białek techniką ELISA. Na podstawie oceny zdolności mutantów *hat/hdac* do indukcji SE wskazano *HAT* i *HDAC* o funkcji potencjalnych regulatorów odpowiedzi embriogenicznej. Większość linii *hat/hdac* wykazało obniżoną zdolność do SE, co dowodzi pozytywnej roli odpowiednich HAT/HDAC w regulacji SE. Wyjątkiem były mutanty w genie *HAG1/GCN5* (*hag1-5* i *gcn5-1*) oraz linia z interferencyjnym wyciszeniem genu *HDA19* (*HDA19:RNAi*), wykazujące podniesiony potencjał embriogeniczny. Sugeruje to, że acetylotransferaza HAG1/GCN5 i deacetylaza HDA19 mogą pełnić rolę negatywnych regulatorów SE. Wykazano, że HAG1/GCN5 i HDA19 kontrolują ekspresję genów SE-*TFs* w SE zarówno hamując (*LEC1* i *LEC2*), jak i promując (*BBM*) ich transkrypcję. Ponadto analiza ChIP potwierdziła udział HDA19 w regulacji *LEC2* przez Hac w SE.

Poza wykazaniem, że Hac reguluje geny SE-*TFs*, w pracy udokumentowano także, że podczas indukcji embriogenicznej Hac bierze udział w regulacji genów docelowych dla SE-*TFs*. Wykazano, że AGL15 TF, na drodze zależnej od Hac, kontroluje aktywność

transkrypcyjną genów *DCL1* (*DICER-LIKE 1*) i *SERRATE*, zaangażowanych w biogenezę cząsteczek mikroRNA (miRNA), podczas indukcji SE. Inny zaangażowany w SE TF, AP2 może z kolei z udziałem Hac regulować ekspresję genu *TF WUS*. Postuluje się, że zarówno AGL15, jak i AP2 mogą rekrutować kompleks represorowy z HDAC, prowadzący do deacetylacji histonów i wyciszenia aktywności transkrypcyjnej genów docelowych.

Podsumowując, przeprowadzone w ramach pracy badania dostarczyły nowych eksperymentalnych dowodów na udział Hac w kontroli ekspresji genów *TFs* o kluczowej roli w indukcji procesu SE. Wykazano, że Hac może także uczestniczyć w regulacji ekspresji genów znajdujących się pod bezpośrednią kontrolą SE-TFs. Uzyskane w ramach realizacji pracy wyniki wskazują na centralną funkcję Hac w regulacji sieci genów kontrolujących indukcję SE. Ponadto wyniki te wytyczają dalsze kierunki w badaniach nad rolą procesów epigenetycznych w embriogenicznym reprogramowaniu somatycznych komórek roślin w kulturze *in vitro*.