

Procesy komórkowe wymagają ścisłej kontroli ekspresji genów. Jednym z mechanizmów biorących w tym udział jest regulacja epigenetyczna. W naszym obszarze zainteresowań jest regulacja procesów neurogenezy regulowanej przez mechanizmy epigenetyczne. Szczególnie interesujące dla nas jest bardzo słabo poznane białko Prdm3 (*PR-Domain Zinc Finger Protein3*). Jest to czynnik, który pełni funkcje metylotransferazy. Pozostaje jednak wiele pytań do rozwiązania: jak to białko rozpoznaje sekwencje DNA, jakie sekwencje, na ekspresję jakich genów wpływa podczas neurogenezy, czy działa sam czy w kompleksie z innymi białkami?

Jako model neurogenezy *in vitro* wykorzystamy indukcję różnicowania neuronalnego w komórkach linii P19 (komórki mysiego raka zarodkowego) za pomocą kwasu retinowego. Nasze wstępne wyniki wskazują, że Prdm3 może mieć newralgiczny wpływ na procesy zachodzące w komórkach nerwowych. Aby to udowodnić, zastosujemy metodę CRISPR-Cas9, która pozwoli nam całkowicie "wyłączyć" gen Prdm3. Planujemy zbadać ekspresję szeregu genów zaangażowanych w neurogenezę oraz ekspresję genów w stadium dojrzałych neuronów. Wyniki innych grup badawczych sugerują pośrednio, że Prdm3 może wpływać na ekspresję innych genów poprzez tworzenie kompleksów białkowych. W celu wskazania składu tego kompleksu białkowego wykorzystamy chromatografię cieczową połączona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS, ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*). Następnie otrzymane wyniki potwierdzimy metodami ko-immunoprecypitacji (co-IP) oraz immunodetekcji białek (Western Blot). W celu określenia znaczenia poszczególnych białek w kompleksie w trakcie neurogenezy użyjemy metody interferencji RNA (siRNA). Metoda ta polega powoduje degradację specyficznego mRNA, a konsekwencją tego zjawiska jest brak funkcjonalnego białka. W innych modelach badawczych wykazano, że białko Prdm3 może wpływać na poziom kondensacji chromatyny. Te mechanizmy mają kolosalne znaczenie w kontroli dostępu czynników transkrypcyjnych do docelowej sekwencji DNA. Z tego też powodu, zbadamy wpływ odkrytych przez nas czynników na zmiany struktury chromatyny w przebiegu neurogenezy za pomocą metody NoME Seq (*Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing*). Wymieniona metoda służy ocenie poziomu metylacji CpG w sekwencji nukleotydowej wytypowanych genów, ale również jednoczesnego pozycjonowania nukleosomów. Analiza opisanych modyfikacji będzie przeprowadzona metodą sekwencjonowania.

Nasze badania mają za zadanie poznać część mechanizmów epigenetycznych biorących udział w procesach neurogenezy. Uważamy, że poznanie tych zjawisk może leżeć u podstaw przyszłych metod w medycynie regeneracyjnej.