

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Szkoła Doktorska Nauk Przyrodniczych

Wydział Biologii



Rozprawa doktorska

**Rola helikaz RNA z rodziny DEAD-box: DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie
mikroRNA u roślin**

Monika Józwiak

Praca napisana pod kierunkiem

Prof. dra hab. Artura Jarmołowskiego

oraz dra Mateusza Bajczyka

Poznań, 2024

Podziękowania

Szczególne podziękowania składam mojemu promotorowi Panu Profesorowi **Arturowi Jarmołowskiemu** za cenne wskazówki, nieocenioną pomoc oraz wsparcie, jakie otrzymałam w trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej.

Serdeczne podziękowania składam mojemu promotorowi pomocniczemu, dr **Mateuszowi Bajczykowi** za wielką cierpliwość, okazane wsparcie i długie dyskusje naukowe.

Pragnę podziękować również Pani Profesor **Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej** za konstruktywne dyskusje, merytoryczną krytykę, ogromne wsparcie i wszelką pomoc.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do **Koleżanek i Kolegów z Zakładu Ekspresji Genów** za wspaniałą atmosferę pracy, okazaną życzliwość i dzielenie się swoim doświadczeniem.

Finansowanie

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów OPUS 2021/41/B/NZ1/03644 (dla dra Mateusza Bajczyka) oraz PRELUDIUM 2021/41/N/NZ1/03430 (dla mgr Moniki Józwiak).



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Publikacje

Lista publikacji naukowych, których jestem współautorką:

Mateusz Bajczyk *, Artur Jarmolowski *, **Monika Jozwiak** *, Andrzej Pacak *, Halina Pietrykowska *, Izabela Sierocka *, Aleksandra Swida-Barteczka *, Lukasz Szewc * & Zofia Szweykowska-Kulinska, Recent Insights into Plant miRNA Biogenesis: Multiple Layers of miRNA Level Regulation. *Plants*, 12.2 (2023): 342.

*Autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy

Monika Jozwiak, Dawid Bielewicz, Zofia Szweykowska-Kulinska, Artur Jarmolowski, Mateusz Bajczyk, SERRATE: a key factor in coordinated RNA processing in plants, *Trends in Plant Science*, 2023, ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.03.009>.

Dawid Bielewicz, Jakub Dolata, Mateusz Bajczyk, Lukasz Szewc, Tomasz Gulanicz, Susheel S. Bhat, Anna Karlik, **Monika Jozwiak**, Artur Jarmolowski, Zofia Szweykowska-Kulinska, Hyponastic Leaves 1 interacts with RNA Pol II to ensure proper transcription of microRNA genes, *Plant and Cell Physiology*, 2023, pcad032, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad032>.

Spis treści

Wykaz skrótów	7
Streszczenie.....	10
Abstract.....	12
1. Wstęp.....	14
1.1. Rola mikroRNA u roślin	14
1.1.1. MikroRNA – kluczowe regulatory rozwoju rośliny	14
1.1.2. Rola miRNA w reakcji roślin na stres niedoboru fosforanów	15
1.2. Biogeneza roślinnych miRNA	16
1.3. Białka zaangażowane w biogenezę roślinnych miRNA	18
1.3.1. Komponenty roślinnego Mikroprocesora.....	18
1.3.2. Helikazy uczestniczące w dojrzewaniu prekursorów miRNA	21
1.4. Wpływ struktury pri-miRNA na biogenezę miRNA	22
1.5. Charakterystyka rodziny DEAD-box	26
1.6. Funkcja ludzkich homologów DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie miRNA	27
1.7. Charakterystyka roślinnych helikaz DRH1, RH46 i RH40	28
2. Cel naukowy rozprawy	32
3. Materiały.....	33
3.1. Wektory.....	33
3.2. Materiał roślinny.....	33
3.3. Materiały do hodowli roślin	34
3.4. Materiały do pracy z bakteriami.....	34
3.5. Odczynniki użyte podczas pracy z białkami	35
3.6. Bufory używane do transfekcji protoplastów	37
3.7. Bufory do pracy z DNA i RNA	38
3.8. Bufory wykorzystane do frakcjonowania	39
3.9. Lista zastosowanych oligonukleotydów	39
3.10. Lista odczynników, roztworów i zestawów gotowych.....	43
4. Metody.....	47
4.1. Hodowla roślin.....	47
4.2. Przygotowanie konstrukcji wykorzystanych w pracy	47
4.3. Eksperymenty z wykorzystaniem białek.....	50
4.4. Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych	54
4.5. Eksperymenty z wykorzystaniem mikroskopii.....	59
4.6. Transformacja roślin metodą „floral dip”	62
4.7. Analizy bioinformatyczne.....	62
5. Wyniki	65

5.1.	DRH1 bezpośrednio oddziałuje z SERRATE	65
5.2.	Charakterystyka mutantów <i>Arabidopsis thaliana</i> pozbawionych helikaz DRH1, RH46 i RH40	68
5.3.	Charakterystyka linii transgenicznej ekspresyjnej helikazę DRH1 w tle potrójnego mutantu helikazowego.....	72
5.4.	Białka oddziałujące z DRH1	75
5.5.	Analiza oddziaływania DRH1 z domeną CTD RNA polimerazy II.....	84
5.6.	Analiza transkryptomu mutantu <i>drh1-1 rh46-1 rh40-1</i>	89
5.7.	Globalna analiza miRNA u potrójnego mutantu helikazowego <i>drh1-1 rh46-1 rh40-1</i>	95
5.8.	Badanie struktury drugorzędowej wyselekcjonowanych pri-miRNA.....	101
5.9.	Wpływ badanych helikaz na ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź rośliny na niedobór fosforanów.....	131
6.	Dyskusja.....	134
6.1.	DRH1 jest zasocjowane z czynnikami zaangażowanymi w biogenezę miRNA	134
6.2.	DRH1 oddziałuje z SERRATE	135
6.3.	DRH1 oddziałuje z ARGONAUTE1	136
6.4.	Wpływ helikaz DRH1, RH46 i RH40 na biogenezę miRNA	137
6.5.	Wpływ helikaz DRH1, RH46 i RH40 na transkryptom	139
6.6.	Wpływ helikaz DRH1, RH46 i RH40 na strukturę pre-miRNA	140
6.7.	Czy helikazy DRH1, RH46 i RH40 są zaangażowane w regulację genów związanych z odpowiedzią rośliny na stres niedoboru fosforu lub inne stresy? ...	145
7.	Podsumowanie.....	147
8.	Literatura.....	148

Wykaz skrótów

A	adenina
aa	aminokwas
AGO1	ARGONAUTE1
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BAK1	BRI1-ASSOCIATED KINASE 1
BKK1	BAK1-LIKE1
C	cytozyna
CDC5	Cell division cycle 5-like protein
cDNA	komplementarne DNA
CHR2	CHROMATIN-REMODELLING FACTOR 2
CPL1	C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1
CTD	C-TERMINAL DOMAIN
DCL1	DICER-LIKE1
DDX5	DEAD-box HELICASE 5
DDX17	DEAD-box HELICASE 17
DMS	siarczan (VI) dimetylu
DRH1	DEAD-box RNA HELICASE 1
dsRNA	dwuniciowe RNA
dsRBD	domena wiążąca dsRNA
EGFP	ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN
EJC	ang. exon junction complex
FRET-FLIM	FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER by FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING
G	guanina
GRP7	GLYCINE RICH PROTEIN 7
HEN1	HUA ENHANCER 1
HESO1	HEN1 SUPPRESSOR 1
HYL1	HYPONASTIC LEAVES 1
IDR	ang. intrinsically disordered region, wysoce nieuporządkowany rejon białka
IPS1	INDUCTED BY PHOSPHATE STARVATION1

<i>MIR</i>	gen kodujący miRNA
miRNA	mikroRNA
mRNA	matrycowy RNA
NES	nuclear export signal
NEXT	Nuclear exosome targeting complex
NLA	NITROGEN LIMITATION ADAPTATION
NLS	nuclear localization signal
NMD	Nonsense-mediated decay
OLE1	OLEOSIN 1
PCR	ang. polymerase chain reaction
PHO2	PHOSPHATE 2
PHT1	PHOSPHATE TRANSPORTER 1
Pi	jony fosforanowe (PO_4^{-3} lub HPO_4^-)
pre-miRNA	prekursor miRNA
pri-miRNA	pierwotny prekursor miRNA
PRP39A	Pre-mRNA-processing factor 39-1
RCF1 (RH42)	REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION 1
RH6	RNA HELICASE 6
RH8	RNA HELICASE 8
RH12	RNA HELICASE 12
RH27	RNA HELICASE 27
RH40	RNA HELICASE 40
RH46	RNA HELICASE 46
RIN	ang. RNA integrity number
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	kwasy rybonukleinowe
RNAPII	DNA-dependent RNA polymerase II
RNP	ribonucleoprotein
rRNA	rybosomowy RNA
RT-qPCR	ang. Reverse transcriptase quantitative PCR
SDS	dodecylosiarczan sodu
SE	SERRATE

SEM	ang. standard error of the mean
SMA1	SMALL 1
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE
sRNA	small RNA
T	tymina
TCP	TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR1
T-DNA	transfer DNA
TEMED	N,N,N',N'-TETRAMETHYLETHYLENEDIAMINE
TREX	TRanscription and EXport complex
tRFP	tag RED FLUORESCENCE PROTEIN
UBQ4	UBIQUITIN 4
UTR	region RNA niepodlegający translacji

Streszczenie

MikroRNA (miRNA) to krótkie, jednoniciowe i niekodujące RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. W proces ich powstawania zaangażowanych jest wiele białek. Trzy kluczowe to: DICER LIKE1 (DCL1), HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) oraz SERRATE (SE), które tworzą rdzeń kompleksu zwanego Mikroprocesorem. Wcześniejsze analizy przeprowadzone w Zakładzie Ekspresji Genów UAM wykazały, że SE występuje w kompleksach z helikazami RNA z rodziny DEAD-box: DRH1 (RH14), RH46 i RH40, co mogło wskazywać na zaangażowanie tych helikaz w biogenezę miRNA. W celu zrozumienia funkcji DRH1, RH46 i RH40 w metabolizmie RNA postanowiono zbadać oddziaływanie tych białek z SE. Za pomocą techniki FRET-FLIM wykazano, że DRH1, RH46 i RH40 bezpośrednio oddziałują z SE. Ponadto, zbadano fenotyp potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w standardowych (22°C) i zmienionych (16°C) warunkach wzrostu. Analizy te wykazały występowanie zmian fenotypowych u roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanej w obniżonej temperaturze. Fenotyp typu dzikiego został jednak przywrócony u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* pod wpływem ekspresji białka fuzyjnego GFP-DRH1. Uzyskana linia transgeniczna została wykorzystana do zbadania partnerów białkowych helikazy DRH1 za pomocą koimmunoprecypitacji połączonej ze spektrometrią mas (LS-MS/MS). Analiza interaktomu białkowego DRH1 wykazała, że DRH1 tworzy kompleksy z wieloma białkami zaangażowanymi w biogenezę miRNA: HESO1, CDC5, GRP7, CPL1, a także AGO1, które stanowiło jedno z najbardziej wzbogaconych białek w analizie. Oddziaływanie pomiędzy DRH1 i AGO1 zostało potwierdzone za pomocą techniki FRET-FLIM.

Następnie, za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq) został przeanalizowany poziom miRNA w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Dane te pokazały zmiany w akumulacji miRNA u roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C i 16°C. Dodatkowo, wykazano, że zgodnie z przewidywaniami, DRH1 oddziałuje bezpośrednio z domeną CTD RNA polimerazy II. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazały jednak, że w przeciwieństwie do badań *in silico*, domena WW obecna w strukturze helikazy DRH1, nie jest niezbędna do występowania tego oddziaływania. W celu zbadania wpływu DRH1, RH46 i RH40 na strukturę drugorzędową wybranych prekursorów miRNA zoptymalizowano metodę celowanego DMS-MaPseq. Analizy wykazały, że brak helikaz

DRH1, RH46 i RH40 powoduje występowanie zmian w strukturze niektórych z testowanych prekursorów.

Otrzymane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dane sugerują, że helikazy DRH1, RH46 i RH40 wpływają na biogenezę wyselekcjonowanych miRNA poprzez modelowanie struktury drugorzędowej ich prekursorów.

Słowa kluczowe: miRNA; biogeneza miRNA; helikazy DEAD-box; struktura drugorzędowa RNA

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short, single-stranded and non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. The process of miRNA production is intricate and involves a multitude of proteins. It is believed that the most significant factors are: DICER LIKE1 (DCL1), HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) and SERRATE (SE), which collectively constitute the core of the Microprocessor complex. The experiments conducted at the Department of Gene Expression have demonstrated that SE is associated with three RNA helicases from the DEAD-box family designated DRH1 (RH14), RH46 and RH40. In order to gain insight into a role of DRH1, RH46 and RH40 in RNA metabolism in *Arabidopsis*, the interaction between the aforementioned helicases and SE was studied using the FRET-FLIM technique. The analysis demonstrated that all three helicases directly interact with SE. Furthermore, the phenotype of the *drh1-1 rh46-1 rh40-1* mutant at standard (22°C) and modified (16°C) growth conditions was evaluated. The analysis revealed alternations in the phenotype of the mutant cultivated at a lower temperature. The *drh1-1 rh46-1 rh40-1* mutant phenotype was successfully rescued by the expression of GFP-DRH1 fusion protein in the *drh1-1 rh46-1 rh40-1* mutant background. This transgenic line was used to study the DRH1 interactome, utilizing the LS-MS/MS technique. The analysis showed that DRH1 is associated with a few miRNA biogenesis factors, including HESO1, CDC5, GRP7, CPL1 and AGO1, which was identified as one of the most enriched proteins in the analysis. The DRH1-AGO1 interaction was validated using the FRET-FLIM technique.

Subsequently, the level of miRNAs in the *drh1-1 rh46-1 rh40-1* mutant was evaluated through next-generation sequencing (RNA-seq). The analysis showed changes in miRNA accumulation in the mutant when cultivated at 22°C and 16°C. Furthermore, the results demonstrated that DRH1 interacts with the CTD domain of RNAPII, which is in accordance with the *in silico* predictions. However, the analysis demonstrated that the WW domain is not essential for this interaction, contrary to the initial *in silico* prediction. Moreover, the secondary structure of selected pre-miRNAs in the *drh1 rh46 rh40* mutant was investigated using the targeted DMS-MaPseq technique. The studies reveal alterations in the structure of a particular subset of pre-miRNAs.

In conclusion, the data presented here suggest that DRH1, RH46 and RH40 influence the biogenesis of miRNAs, potentially by modulating the structure of a subset of miRNA precursors.

Key words: miRNA; miRNA biogenesis; DEAD-box helicases; RNA secondary structure

1. Wstęp

1.1. Rola mikroRNA u roślin

1.1.1. MikroRNA – kluczowe regulatory rozwoju rośliny

mikroRNA (miRNA) to krótkie jednoniciowe i niekodujące RNA regulujące ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. miRNA działają wspólnie z białkiem ARGONAUTE 1 (AGO1), wyszukując transkrypty mRNA komplementarne do miRNA. Po znalezieniu komplementarnej cząsteczki mRNA, zostaje ona przecięta przez AGO1 bądź związana w okolicach 3'UTR mRNA, blokując w ten sposób jego translację. Pierwsze doniesienia o miRNA pochodzą z roku 1993, kiedy to pokazano, że krótki niekodujący RNA *lin-4* reguluje rozwój larw *Ceanorhabditis elegans* (1). W przypadku roślin, pierwsza publikacja pokazująca występowanie miRNA została opublikowana w roku 2002 przez Reinharta i współpracowników (2). Praca ta zapoczątkowała lawinę badań nad roślinnymi miRNA oraz ich funkcją u roślin. Opublikowane wyniki jasno wskazują, że miRNA są podstawowymi regulatorami rozwoju *A. thaliana*. Na przykład miRNA319 reguluje morfogenezę liści i korzeni poprzez kontrolowanie poziomu mRNA kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR1 (TCP) (3). W korzeniach obniżenie ekspresji białek TCP, regulowanych przez miRNA319, pozwala na prawidłową aktywność wierzchołka wzrostu korzenia i rozwój korzeni, podczas gdy w liściach, to samo zjawisko powoduje zmiany w wielkości liści, ich złożoności i kształcie (3,4,5). miRNA319 opóźnia także starzenie się liści poprzez regulowanie poziomu TCP4 stymulującego ekspresję genu kodującego enzym uczestniczący w biosyntezie jasmonianu (6). Ponadto, miRNA regulują również przejście rośliny z fazy wegetatywnej w fazę generatywną. Proces ten zależny jest od produkowanych sekwencyjnie miRNA156 i miRNA172. Poziom miRNA156 jest najwyższy w kiełkujących siewkach, a następnie stopniowo spada podczas rozwoju pędu, powodując wzrost poziomów jego docelowych mRNA kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL). Jedno z tych białek, SPL9, jest regulatorem transkrypcji genu kodującego miRNA172b. miRNA172b wpływa na ekspresję czynników transkrypcyjnych z rodziny APETALA2-LIKE (APE2-like), które regulują rozwój kwiatów u roślin (7).

1.1.2. Rola miRNA w reakcji roślin na stres niedoboru fosforanów

Rośliny są nieustannie narażone na złożone stresy środowiskowe, które wymagają ich szybkiej reakcji w celu adaptacji i przetrwania. Jak wykazano, jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w reakcję roślin na stresy środowiskowe są miRNA, biorące udział w odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne i biotyczne. Wykazano na przykład, że stres obniżonej temperatury powodował zmianę poziomu 79 dojrzałych miRNA (8), podczas gdy podwyższona temperatura skutkowałą zmianą poziomu 33 dojrzałych miRNA (9). Warunki silnej suszy powodowały natomiast zmiany w poziomie 77 miRNA (9). Ciekawy mechanizm zaobserwowano podczas odpowiedzi rośliny na stres niedoboru siarczanów. Pokazano, że miRNA395, którego poziom wzrasta w warunkach niedoboru tego elementu, reguluje poziom transportera siarczanów SULTR2;1. Akumulacja miRNA395 powoduje, że ekspresja SULTR2;1 jest ograniczona i następuje tylko w miąższu ksylemu, co skutkuje zwiększonym transportem siarczanów z korzeni do pędów i zapobiega jego transportowi z pędów do korzeni (10,11). Pomimo wieloletnich badań nad reakcjami roślin na stresy środowiskowe, jedną z najlepiej opisanych reakcji pozostaje odpowiedź rośliny na stres niedoboru fosforanów.

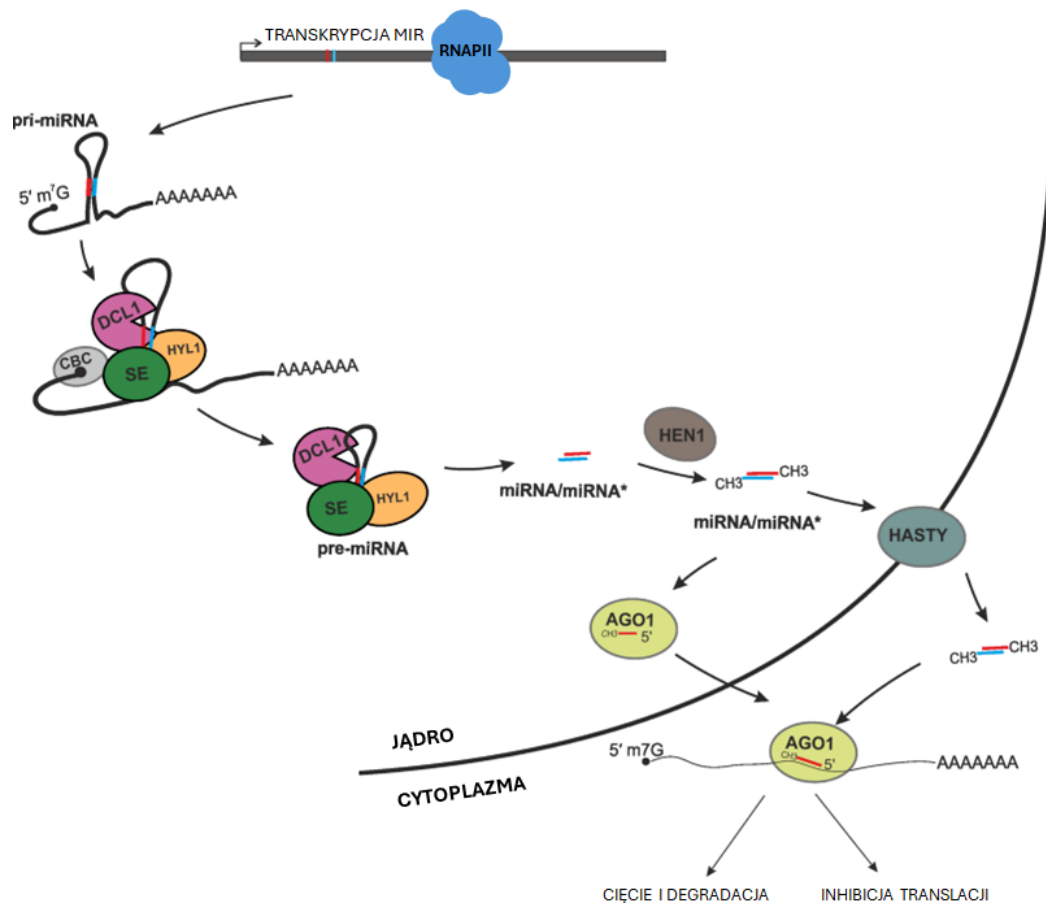
Fosfor jest czynnikiem niezbędnym dla prawidłowego wzrostu, rozwoju i funkcjonowania roślin. Stanowi podstawowy składnik kwasów nukleinowych, fosfolipidów i ATP (12). Najbardziej dostępną formą fosforu dla roślin są jony fosforanowe (PO_4^{3-} lub HPO_4^-), określane jako Pi, których dostępność w glebie bywa niewielka (13). Brak dostępnego fosforu indukuje zmiany w poziomach wielu miRNA, które umożliwiają roślinie adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych. Głębokie sekwencjonowanie małych RNA wykazało, że brak Pi prowadzi do istotnej statystycznie zmiany w poziomie 45 miRNA w korzeniach i 55 miRNA w pędach. W warunkach niedoboru fosforanów najwyższą akumulacją charakteryzują się dwa miRNA, miRNA399 oraz miRNA827. Genom *Arabidopsis* koduje sześć miRNA399 (a-f), które są indukowane przez brak Pi w różnym stopniu (14). W warunkach niedoboru fosforanów miRNA399 oraz miRNA827 pośrednio podwyższają poziom białek z rodziny PHOSPHATE TRANSPORTER 1 (PHT1) (15-17). U *Arabidopsis* zidentyfikowano 9 genów PHT1 (PHT1;1 – PHT1;9) kodujących błonowe kotransportery o wysokim powinowactwie do fosforanu (18,19). Wszystkie białka PHT1, z wyjątkiem PHT1;6, które ulega ekspresji w tapetum i ziarnach pyłku, obecne są w tkankach korzeni (19). miRNA399 oraz miRNA827 obniżają poziomy odpowiednio mRNA

PHOSPHATE 2 (PHO2) i transkrypty kodującego NITROGEN LIMITATION ADAPTATION (NLA), które powodują przyłączenie ubikwityny do białek PHT1, kierując je w ten sposób do degradacji. Obniżenie poziomu PHO2 i NLA prowadzi zatem do podwyższenia poziomu PHT1, zwiększenia liczby transporterów PHT1 w błonach, a przez to do zwiększenia poboru fosforanów z gleby (20,21). Aktywność miRNA399 jest regulowana przez dwa niekodujące białek geny *INDUCTED BY PHOSPHATE STARVATION1 (IPSI)* oraz *At4*, które są silnie indukowane przez brak Pi. Ich transkrypty zawierają sekwencje niemal komplementarne do sekwencji miRNA399, za wyjątkiem kilku niedopasowanych zasad w miejscu cięcia przez to miRNA. Prowadzi to do wychwycenia i związania miRNA399, uniemożliwiając im w ten sposób cięcie PHO2. Reakcja ta stanowi precyzyjny mechanizm kontroli odpowiedzi na niedobór fosforu i utrzymania homeostazy (22,23). Głębokie sekwencjonowania małych RNA wykazały także, że przy braku Pi silnie wzrasta poziom miRNA z rodziny miR2111, jednak ich funkcja w reakcji na ten stres nie została jeszcze zbadana (14).

1.2. Biogeneza roślinnych miRNA

Biogeneza roślinnych miRNA jest złożonym procesem, w który zaangażowanych jest wiele białek (24). U roślin, większość genów kodujących miRNA (*MIR*) jest niezależnymi jednostkami transkrypcyjnymi. Tylko część z genów *MIR* usytuowana jest w intronach genów kodujących białka (25). Wszystkie jednak ulegają transkrypcji przez RNA Polimerazę II (RNAPII). Powstałe pierwotne transkrypty (pri-miRNA) zawierają charakterystyczne dla produktów RNAPII struktury: ogon poli(A), złożony z wielokrotnie powtórzonej adeniny na 3' końcu oraz czapkę zwaną także kapem (ang. *cap*), która jest dodatkowym, zmetylowanym nukleotydem (7-metyloguanozyną) przyłączonym za pomocą wiązania 5',5'-trójfosforanowego do końca 5' łańcucha RNA. Ponadto, każdy pierwotny transkrypt przyjmuje strukturę spinki do włosów (ang. *stem-loop structure*) o różnej złożoności właściwej dla konkretnego pri-miRNA, w trzonie której zlokalizowany jest dupleks miRNA/miRNA* zawierający sekwencję miRNA oraz komplementarną do niego sekwencję miRNA* (26). Dupleks ten wycinany jest z prekursora przez RNazę typu III DICER-LIKE1 (DCL1) w dwóch reakcjach cięcia. Pierwsze cięcie prowadzi do powstania krótszego prekursora zwanego pre-miRNA, który obejmuje strukturę spinki do włosów. Następnie pre-miRNA jest docinane przez DCL1, uwalniając w ten sposób dupleks

miRNA/miRNA* (26). W przeciwieństwie do zwierząt, u których pierwsze cięcie katalizowane jest przez endonukleazę DROSHA w jądrze komórkowym, a drugie w cytoplazmie przez DICER1, u roślin oba cięcia zachodzą na terenie jądra komórkowego i są przeprowadzane przez jeden enzym DCL1 (25). U roślin, precyzja i efektywność obu cięć wspomagana jest przez dwa inne czynniki: zawierające domenę palca cynkowego białko SERRATE (SE) oraz przez białko wiążące dwuniciowy RNA (dsRNA) HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) (27). Następnie, uwolniony dupleks miRNA/miRNA* jest metylowany na obu 3' końcach dupleksu przez białko HUA ENHANCER 1 (HEN1) w celu zabezpieczenia dupleksu przed degradacją (28,29). Przez wiele lat sądzono, że po metylacji dupleks jest transportowany do cytoplazmy przez białko HASTY (30), gdzie miRNA zostaje załadowany na AGO1, tworząc w ten sposób indukowany przez RNA kompleks wyciszający (ang. *RNA-induced silencing complex*, RISC) (31). Jednakże późniejsze badania pokazały, że po metylacji miRNA łądowany jest na AGO1 jeszcze w jądrze komórkowym, a następnie jest eksportowany w formie kompleksu miRNA-AGO1 przez CMR1/EXPORTIN1 (EXPO1) (32). Możliwym jest, że biogeneza miRNA u roślin przebiega w jądrowych ciałkach D (ang. *D-bodies*), które stanowią skupisko najważniejszych dla biogenezy miRNA białek: DCL1, HYL1 oraz SE (33). Schemat przebiegu biogenezy miRNA u roślin przedstawiony został na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat powstawania miRNA u roślin. RNAPII – RNA polimeraza II; MIR – gen kodujący miRNA; pri-miRNA – pierwotny transkrypt genu MIR; DCL1 – DICER LIKE 1; HYL1 – HYPONASTIC LEAVES 1; SE – SERRATE; CBC – kompleks wiążący kap, składający się z dwóch podjednostek, CBP20 i CBP80; HEN1 – HUA ENHANCER 1; AGO1 – ARGONAUTE 1. Autor – dr Agata Stępień, zmodyfikowane.

1.3. Białka zaangażowane w biogenezę roślinnych miRNA

1.3.1. Komponenty roślinnego Mikroprocesora

U *Arabidopsis* maszynę odpowiedzialną za biogenezę miRNA określa się, podobnie jak u zwierząt, mianem Mikroprocesora. Rdzeń roślinnego Mikroprocesora tworzą DCL1, SE oraz HYL1, które wzajemnie ze sobą oddziałują (25). W budowie endorybonukleazy DCL1 wyróżnia się siedem domen: domenę helikazową typu DExD/H-box, która rozpoznaje i rozplata RNA (34), domenę wiążącą RNA DUF283, domenę PAZ, która występuje u wielu białek zaangażowanych w produkcję miRNA (35), dwie tandemowo ułożone domeny RNazy III oraz dwie domeny wiążące dsRNA, które pośredniczą także w oddziaływaniach typu białko-białko (dsRBD) (34). O

istotności białka DCL1 dla rozwoju i życia rośliny świadczy fakt embriotalności roślin całkowicie tego białka pozbawionych (36), a także występowanie zmian fenotypowych u roślin z niewielką, często punktową mutacją w genie *DCL1*. U mutantów *dcl1-7*, zawierającego punktową mutację w domenie helikazowej oraz *dcl1-9*, zawierającego insercję T-DNA w sekwencji kodującej drugą domenę dsRBD, zaobserwowano podwyższenie poziomów pri-miRNA, z jednoczesnym obniżeniem poziomu dojrzałych miRNA (37). W konsekwencji oba mutanty przejawiają silne zmiany fenotypowe, takie jak małe liście, późne kwitnienie oraz żeńska sterility (36). Mutacja w domenie helikazowej nie wpłynęła na oddziaływanie DCL1 z SE i HYL1, jednak zaburzenie sekwencji kodującej domenę dsRBD uniemożliwiło oddziaływanie z HYL1, jak również spowodowało zmianę w lokalizacji komórkowej tego wariantu DCL1, które nie akumulowało już w ciałach D (37, 38, 39). Co ciekawe, DCL1 z mutacjami w domenie helikazowej RNazy III są w stanie promować właściwe przetwarzanie prekursorów miRNA oraz kompensować brak białka HYL1, przywracając tym samym właściwy poziom pri-miRNA. Jednakże precyzja cięć katalizowanych przez DCL1 w tych mutantach pozostaje zaburzona (34).

Kolejnym ważnym dla prawidłowego funkcjonowania Mikroprocesora czynnikiem jest białko SE. SE składa się z ustrukturyzowanego rdzenia oraz dwóch nieustrukturyzowanych fragmentów znajdujących się na N- i C-końcu białka. W rdzeniu wyróżnia się domenę N-końcową, domenę środkową oraz domenę palca cynkowego typu C2H2. Eksperymenty wykazały, że rdzeń SE stanowi platformę dla oddziaływań z HYL1 i DCL1. Ponadto, część rdzenia składająca się na domenę palca cynkowego, wspólnie z nieustrukturyzowanym fragmentem C-końcowym, rozpoznają pri-miRNA (40). Co ciekawe, w ostatnich latach pokazano również, że SE zawiera w swojej strukturze trzy wysoce nieuporządkowane obszary (ang. *intrinsically disordered regions*, IDRs). Spośród nich jeden (IDR1) ulokowany w N-końcowym fragmencie SE umożliwia temu białku separację faz (41). Separacja faz jest zjawiskiem polegającym na spontanicznym rozdzieleniu na dwie różne fazy ciekłe jednorodnej mieszaniny zawierającej polimery, cząsteczki organiczne i białka. W komórkach organizmów żywych prowadzi do powstania organelli bez błonowych koordynujących złożone reakcje biochemiczne.

Podobnie jak w przypadku DCL1, całkowity brak SE skutkuje embriotalnością, a mutacje pozwalające na powstanie zmienionych form SE powodują znaczne zmiany w fenotypie roślin. Niewielka delecja w rejonie 3' końca

genu kodującego SE (*se-1*), insercja T-DNA w egzonie 10 (*se-2*) lub 1 (*se-3*) skutkują zmianami w filotaksji (układzie ułożenia liści na łodydze) oraz prawidłowym funkcjonowaniu tkanek merystematycznych, prowadząc do rozwoju charakterystycznych dla mutacji w genie *SE* ząbkowanych liści. Ponadto, u *se-2* liście są mniejsze i wygięte ku górze, podczas gdy rośliny *se-3* są niezwykle małe i przejawiają obniżoną płodność (42-44). We wszystkich mutantach *se* zaobserwować można jednak obniżony poziom miRNA, przy jednoczesnej akumulacji pri-miRNA (42,44,45). Chociaż przez wiele lat funkcję w biogenezie miRNA opisywano jako najważniejszą rolę SE, to najnowsze dane pokazują, że jest to zaledwie jedna z bardzo wielu funkcji tego białka u roślin (45). SE jest bowiem zaangażowane w regulację transkrypcji (46,47), splicing, zarówno konstytutywny (48), jak i alternatywny (49, 50) oraz degradację RNA (51,52). Lepsza charakterystyka funkcji SE była możliwa poprzez przeprowadzenie w naszym laboratorium eksperymentu koimmunoprecypitacji połączonej ze spektrometrią mas (51). Z SE współcyszczono jedno z głównych białek Mikroprocesora DCL1 oraz białka HOS5, CPL1, BRM i CDC5, które także związane są z biogenezą miRNA. Jednakże analizy wykazały, że głównymi interaktorami białka SE nie są czynniki biogenezy miRNA, a białka kompleksu TREX (TRanscription and EXport complex), łączącego różne etapy dojrzewania mRNA: transkrypcję, splicing i dojrzewanie końców 3' RNA z eksportem dojrzałych transkryptów z jądra komórkowego do cytoplazmy (53), oraz kompleksu NEXT (ang. *Nuclear EXosome Targeting complex*), odpowiedzialnego za wyszukiwanie do degradacji przez egzozom transpozonów, niewłaściwie obrobionych RNA oraz kryptycznych transkryptów (54). Ponadto, SE jest zasocjowane z dużą liczbą helikaz z rodziny DEAD-box (45).

W skład rdzenia Mikroprocesora wchodzi także białko HYL1 zapewniające wydajność i efektywność cięć przeprowadzanych przez DCL1 (25). HYL1 zawiera dwie domeny wiążące dwuniciowe RNA (dsRBD), z których pierwsza wiąże dsRNA, a druga jest odpowiedzialna za oddziaływanie HYL1 z domeną dsRBD2 DCL1 i rdzeniem SE (40,55). Jest ona także odpowiedzialna za homodimeryzację HYL1 (56) istotną dla prawidłowej aktywności tego białka w biogenezie miRNA. Ponadto, w budowie HYL1 wyróżnić można także nieustrukturyzowany C-końcowy fragment białka składający się z sześciu powtórzeń 28 aminokwasowej sekwencji o niepoznanej jeszcze funkcji. W przeciwieństwie do DCL1 i SE, całkowity brak białka HYL1 nie jest embrioletalny. Mutant *hyl1-2* wykazuje jednak poważne zmiany fenotypowe, takie

jak niewielki wzrost i charakterystyczne hiponastyczne wygięcie liści (57). Ponadto, w mutancie *hyl1-2* zaobserwowano podwyższony poziom wielu pri-miRNA, któremu w większości przypadków towarzyszy obniżony poziom dojrzałych miRNA. Jednakże korelacja ta nie jest prawdą dla wszystkich miRNA, gdyż zidentyfikowano grupę miRNA, których poziom wzrasta w *hyl1-2* wraz ze wzrostem ich prekursorów (58).

1.3.2. Helikazy uczestniczące w dojrzewaniu prekursorów miRNA

W ostatnich latach opublikowanych zostało tylko kilka prac sugerujących udział helikaz w biogenezie miRNA u roślin. Spośród przedstawionych helikaz na większą uwagę zasługuje CHROMATIN-REMODELLING FACTOR 2 (CHR2). CHR2 jest ATPazą i jedną z głównych podjednostek kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF. Udział CHR2 w biogenezie miRNA został zbadany przez Wanga i współpracowników, a uzyskane wyniki zostały opublikowane w roku 2018. Pokazali oni, że CHR2 pełni podwójną rolę w biogenezie miRNA u roślin. Po pierwsze CHR2 promuje transkrypcję genów *MIR*, o czym świadczy obniżony poziom pri-miRNA w mutancie *chr2*. Jednocześnie jednak, CHR2, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z SE, zmienia strukturę związanych przez SE pri-miRNA, uniemożliwiając tym samym wiązanie pri-miRNA przez HYL1 i DCL1 i jego dalszą obróbkę. To jest główny powód obniżenia poziomu dojrzałych miRNA w mutancie *chr2*. Wprowadzenie mutacji w rejonie CHR2 odpowiedzialnym za oddziaływanie tego białka z SE, przywraca właściwy poziom miRNA tylko częściowo, sugerując, że oddziaływanie CHR2-SE jest niezbędne dla potranskrypcyjnej roli CHR2 w biogenezie miRNA. Zaburzenie oddziaływania CHR2-SE nie wpłynęło jednak na transkrypcję *MIR*, co świadczy o tym, że obie funkcje CHR2, transkrypcyjna i potranskrypcyjna, nie są ze sobą powiązane (59).

CHR2 nie jest jedyną opisaną helikazą uczestniczącą w biogenezie miRNA u roślin. Pokazano bowiem, że grupa różnych helikaz z rodziny DEAD-box jest zaangażowana w formowanie ciał D oraz wytwarzanie miRNA. RH6, RH8 i RH12 kolokalizują w komórce ze znanymi komponentami ciał D (DCL1, HYL1, SE), a także oddziałują bezpośrednio z SE oraz HYL1. Dodatkowo, przy braku tych trzech helikaz, liczba ciał D w jądrach komórek kwiatostanu była dużo niższa niż w przypadku roślin typu dzikiego, podczas gdy w komórkach korzenia struktury te nie formowały się wcale. Dodatkowo, przeprowadzono eksperyment, w którym wymieszano oczyszczone białko SE z różnymi stężeniami RH12. RH12 pozostało rozproszone w

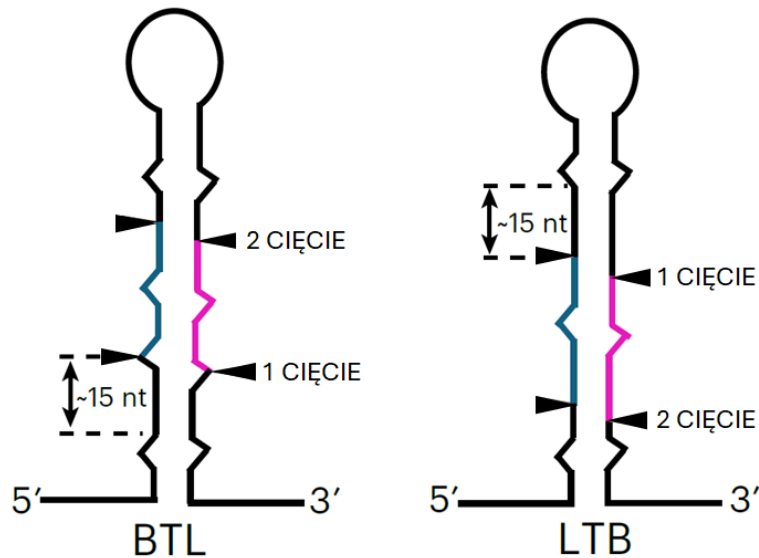
roztworze, podczas gdy wielkość i liczba kropelek SE wzrosła wraz z ilością helikazy. Wynik ten sugeruje, że RH12 promuje separację faz SE *in vitro*. Ponadto, pokazano, że brak RH6, RH8 i RH12 powoduje obniżenie poziomu wybranych pri-miRNA, czemu towarzyszy obniżenie poziomu odpowiadających im dojrzałych miRNA. W mutantach helikaz zaobserwowano także zredukowanie wiązania *MIR* przez RNAPII, co wskazuje, że RH6, RH8 i RH12 ułatwiają wiązanie RNAPII do genów *MIR* (60). Na formowanie ciał D wpływ ma także helikaza typu DEAD-box RCF1 (RH42). U mutantów *rcf1-4* liczba ciał D jest dużo mniejsza niż u roślin typu dzikiego. Co więcej, pokazano również, że RCF1 promuje wiązanie pri-miRNA przez HYL1, a także wpływa na splicing pri- oraz pre-miRNA (61).

W biogenezę miRNA zaangażowane są także SMALL1 (SMA1) oraz RH27, które, podobnie jak RH6, RH8 i RH12, należą do rodziny helikaz typu DEAD-box. Oba białka oddziałują bezpośrednio z głównymi komponentami Mikroprocesora: SMA1 oddziałuje z DCL1, a RH27 z DCL1 i HYL1. Brak obu helikaz jest dla roślin letalny, a mutacje wywołujące częściową utratę funkcji przez te białka prowadzi do obniżenia poziomu pri-miRNA (62, 63). Ponadto, u roślin *smal-1* zaobserwowano zachowanie intronów w przypadku pięciu testowanych prekursorów miRNA, co sugeruje zaangażowanie SMA1 w splicing pri-miRNA (62).

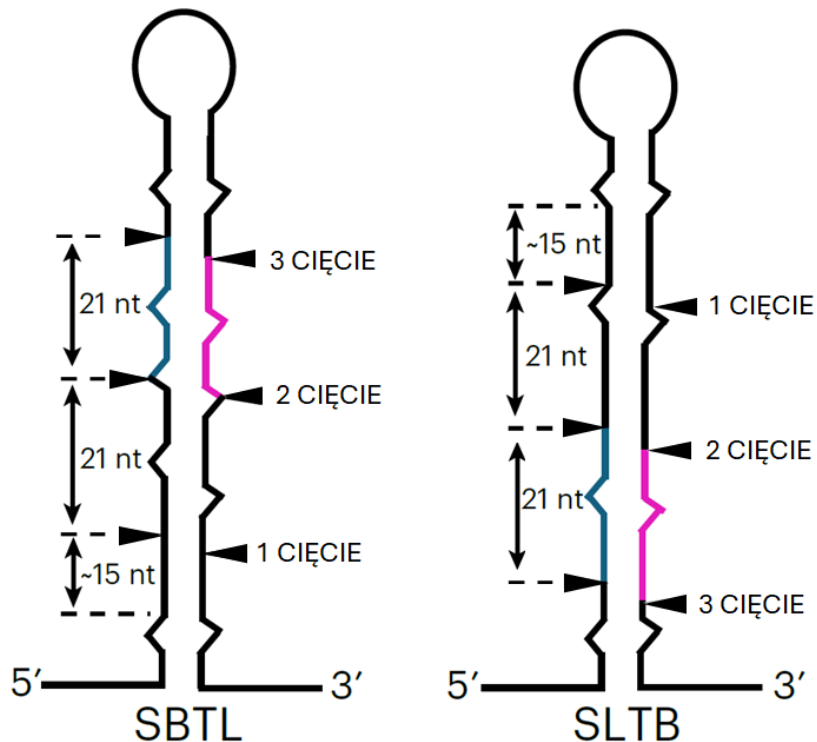
1.4. Wpływ struktury pri-miRNA na biogenezę miRNA

W przeciwieństwie do zwierzęcych struktur spinek zlokalizowanych w pri-miRNA, które są raczej krótkie, a ich długość i struktura nie są zbyt zróżnicowana, roślinne prekursorzy są niezwykle różnorodne pod względem długości, jak i struktury drugorzędowej (64,65). Obecność niesparowań oraz dodatkowych pętli wpływa na precyzję i efektywność przetwarzania prekursorów przez Mikroprocesor (66,67). Pierwsze cięcie przez DCL1 w zależności od pri-miRNA może mieć miejsce u podstawy spinki lub przy górnej pętli spinki. Zależnie od pierwszego cięcia, pri-miRNA zostały podzielone na dwie grupy: wycinane od podstawy do pętli (ang. *base-to-loop*) lub wycinane od pętli do podstawy (ang. *loop-to-base*) (ryc. 2) (65-67). Ponadto, pri-miRNA można podzielić także ze względu na liczbę cięć potrzebnych do uwolnienia dupleksu miRNA/miRNA*: w tym celu DCL1 może przeprowadzić dwa cięcia lub sekwencyjną serię trzech-czterech cięć (ryc. 3) (65,66,68). W przypadku przetwarzania pri-miRNA od podstawy do pętli, Mikroprocesor rozpoznaje niesparowanie w rejonie dsRNA ulokowanym 15-17 nt poniżej dupleksu miRNA/miRNA* i przeprowadza tam pierwsze cięcie (66,69,70). Jeśli pri-miRNA przetwarzany jest od pętli

do podstawy, wówczas pierwsze cięcie ma miejsce poniżej pętli końcowej (66,69,70). W obu przypadkach jednak kolejne cięcia przeprowadzane są przez DCL1 co około 20-22 nt, aż do uwolnienia dupletu miRNA/miRNA* (66,70,71).



Rycina 2. Schemat przedstawiający dwie możliwe drogi przetwarzania pri-miRNA: od podstawy do pętli (ang. base-to-loop, BTL) lub od pętli do podstawy (ang. loop-to-base, LTB). Źródło: Yan, X. et al, 2024 (65), modyfikowane. Kolorem niebieskim i różowym oznaczono odpowiednio sekwencje miRNA i miRNA*.

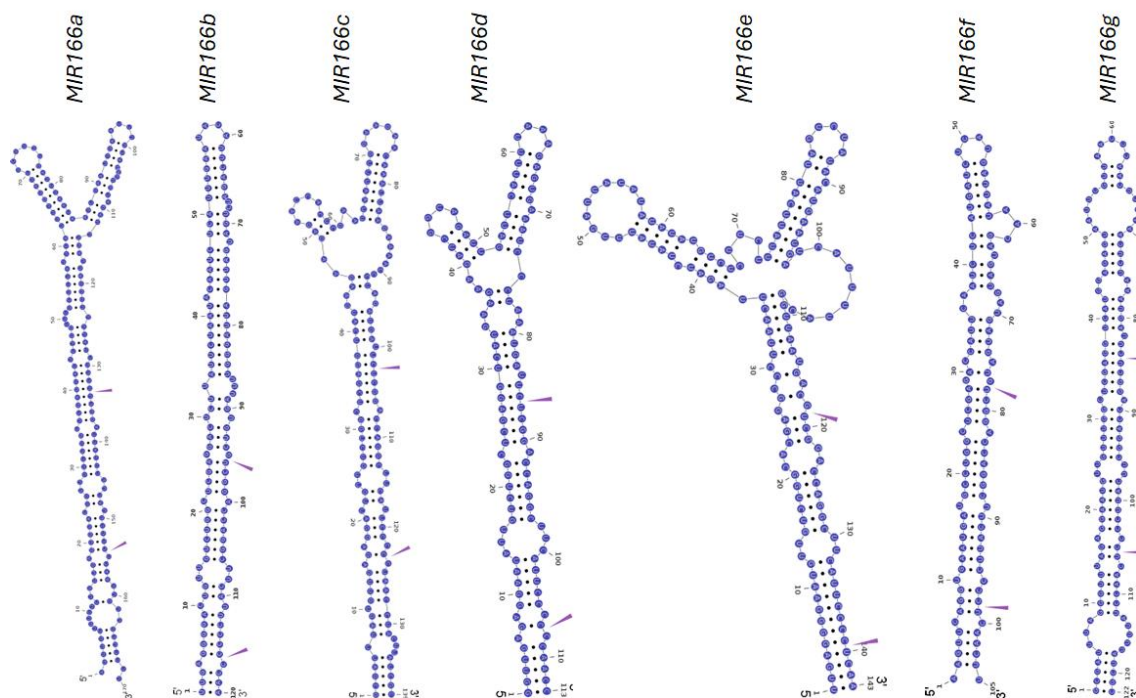


Rycina 3. Schemat przedstawiający sekwencyjny mechanizm przetwarzania pri-miRNA. Cięcia sekwencyjne mogą odbywać się od podstawy do pętli (ang. *sequential base-to-loop, SBTL*) lub od pętli do podstawy (ang. *sequential loop-to-base, SLTB*). Źródło: Yan, X. et al, 2024 (65), modyfikowane. Kolorem niebieskim i różowym oznaczono sekwencje odpowiednio miRNA i miRNA*.

Struktura prekursorów ma duży wpływ na wybór drogi ich dojrzewania, a także wydajność ich obróbki. Badania pokazały, że w przypadku wielu pri-miRNA jednonukleotydomowa zmiana może doprowadzić do całkowitego zatrzymania obróbki prekursora. Wprowadzenie serii przypadkowych mutacji w pri-miR172a wykazało, że mutacje punktowe zlokalizowane w dsRNA poniżej dupleksu miRNA/miRNA* znacząco wpłynęły na przetwarzanie, podczas gdy mutacje w obrębie pętli końcowej nie miały wpływu na obróbkę prekursora. Dodatkowo, mutacje wpływające na przetwarzanie pri-miRNA prowadziły także do destabilizacji struktury tego prekursora (69). W przeciwieństwie do pri-miR172a, modyfikacje w dolnej części pri-miR319 nie wpłynęły na akumulację miR319 w komórce. Usunięcie górnej części spinki lub wprowadzenie dużej pętli końcowej skutkowało z kolei znaczącą redukcją poziomu dojrzałego miR319 (66).

Ciekawym przypadkiem świadczącym o wpływie struktury pre-miRNA na wydajność ich przetwarzania są przedstawiciele rodziny pri-miRNA166. Zaobserwowano, że linie transgeniczne, w których transkrypcja pri-miRNA166 kontrolowana jest przez promotor 35S wykazują zróżnicowane zmiany fenotypowe, począwszy od dużych zmian w budowie liści, aż po fenotypy prawie typu dzikiego. W tych roślinach, nasilenie zmian wynikało z różnego poziomu dojrzałych miRNA. Analizy struktur tych prekursorów wykazały, że prekursorzy te przyjmują jedną z dwóch struktur: są liniowymi spinkami, albo posiadają rozgałęzioną pętlę końcową (ryc. 4). Pri-miRNA166 przyjmujący strukturę liniowej spinki ulegały wyższej ekspresji niż prekursorzy z rozgałęzioną pętlą końcową. Wymiana górnej części spinki pri-miR166c, zawierającej rozgałęzioną pętlę końcową na liniową część spinki pochodzącą z pri-miR166f powodowało znaczący wzrost poziomu miRNA166c, który w natywnych warunkach stanowi miRNA o najniższym poziomie spośród wszystkich członków tej rodziny miRNA. Dodatkowo, oba pri-miRNA wykazują zbliżony poziom transkryptów *in vivo*, co sugeruje, że różnice w poziomie dojrzałych miRNA166 są wynikiem regulacji potranskrypcyjnej. Analizy fragmentów prekursora pri-miR166c po cięciu przez DCL1 wykazały, że prekursor ten może być przetwarzany od podstawy, co skutkuje powstaniem dojrzałego miRNA166c lub alternatywnie może być przetwarzany w kierunku od pętli. Wtedy to pierwsze cięcie przypada w obrębie dupleksu

miRNA/miRNA* i nie prowadzi do powstania dojrzałej cząsteczki miRNA166c. Przeprowadzanie pierwszego cięcia w obrębie duplexu miRNA/miRNA* może zostać znacząco ograniczone poprzez zmniejszenie rozmiaru lub uproszczenie struktury pętli końcowej. Zwiększenie rozmiaru pętli końcowej zwiększa natomiast częstotliwość cięć w obrębie duplexu miRNA/miRNA* (67).



Rycina 4. Przewidywane struktury prekursorów z rodziny miRNA166. Fioletowymi strzałkami zaznaczono lokalizację sekwencji miRNA. Źródło: mirEX2.

Struktura duplexu również ma wpływ na efektywność przetwarzania pri-miRNA. Pokazano, że zwiększone parowanie zasad w duplexie miR172a/miR172a* prowadzi do podwyższenia poziomu dojrzałego miR172a. Wprowadzenie mutacji zwiększających liczbę niedopasowanych nukleotydów powodowało natomiast obniżenie poziomu dojrzałej cząsteczki. Obniżenie poziomu miR172a spowodowane obecnością niedopasowanych nukleotydów, może być zniwelowane, kiedy jako niesparowane nukleotydy wprowadzone zostanie G lub C w obrębie duplexu miRNA/miRNA*. Wykazano bowiem, że dodanie niesparowanych G w obrębie duplexu prowadzi do podwyższenia poziomu dojrzałego miRNA (71). Dodatkowo, parowanie zasad w obrębie duplexu miRNA/miRNA* może być wykorzystywane do inaktywacji ekspresji miRNA *in vivo*. Dzieje się tak w przypadku pri-miR164b, kiedy to helikaza CHR2 upośledza przetwarzanie tego prekursora poprzez zwiększanie ilości niesparowanych zasad w regionie miRNA/miRNA* (59). Jednakże liczba

niesparowanych zasad w obrębie dupleksu miRNA/miRNA* wpływa tylko na biogenezę prekursorów uwalnianych w wyniku dwóch cięć przez DCL1 i nie ma wpływu na obróbkę prekursorów obrabianych sekwencyjnie. Pokazano, że zwiększenie stabilności dupleksu miRNA/miRNA* w pre-miR394a i pre-miR319a, które są przetwarzane sekwencyjnie, odpowiednio od podstawy do pętli i od pętli do podstawy, nie zmienia wydajności ich obróbki i w rezultacie poziom dojrzałych miRNA nie ulega zmianie. Wyniki te sugerują, że podczas gdy obróbka prekursorów przetwarzanych w dwóch cięciach przez DCL1 jest podatna na zmiany w dupleksie miRNA/miRNA*, to sekwencyjnie obrabiane prekursory są niewrażliwe na zmiany w tym rejonie (71).

1.5. Charakterystyka rodziny DEAD-box

Helikazy typu DEAD-box to największa rodzina helikaz RNA. Występują we wszystkich domenach życia (bakterie, archeony i eukarionty) i działają we wszystkich procesach związanych z RNA. Funkcjonują jako białka opiekuńcze RNA i kompleksów RNA-białko (RNP) oraz helikazy RNA. Rdzeń helikaz DEAD-box składa się ze wspólnego dla wszystkich helikaz z tej rodziny regionu o długości około 400 aminokwasów, w którym wyróżnić można 12 zakonserwowanych motywów (Q, I, Ia, Ib, Ic, II, III, IV, IVa, V, Va i VI). Motywy te umożliwiają wiązanie i hydrolizę ATP, wiązanie RNA oraz rozplatanie RNA. Ponadto, rdzeń helikaz DEAD-box tworzy dwie domeny typu RecA, które są połączone elastycznym linkerem. To właśnie w motywie II zlokalizowanym w domenie RecA_N znajduje się motyw DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), od którego wzięła się nazwa rodziny. Poza wysoce konserwatywnym rdzeniem, helikazy DEAD-box zawierają także różniące się składem i długością sekwencje C- i N-końcowe, które regulują aktywność rdzenia (72).

Helikazy DEAD-box wykazują słabą aktywność helikazową. Są zdolne do rozplatania krótkich, niestabilnych dupleksów o długości 10-15 par zasad, które są ubogie w pary G-C. Taką aktywność zaobserwowano w przypadku helikazy eIF4A, która jest niewielką helikazą zaangażowaną w inicjację translacji u ssaków. Wykazano, że eIF4A z łatwością rozplata krótkie fragmenty dsRNA, ale jest znacznie mniej wydajna w przypadku stabilnych dupleksów bogatych w pary GC (72,73). Dodatkowo, helikazy z rodziny DEAD-box przyłączają się bezpośrednio do dupleksu i nie przemieszczają się w trakcie jego rozplatania (74). Nie wykazują też specyficzności sekwencji, a raczej rozpoznają formę A tworzoną przez szkielet fosforanowy kwasów nukleinowych (75). Ponadto, helikazy DEAD-box nie wymagają energii pochodzącej z hydrolizy ATP do rozplatania dupleksów. Podczas

rozplatania dsRNA, domeny RecA przyjmują zamkniętą konformację wynikającą z jednoczesnego związania RNA i ATP. Prowadzi to do wygięcia jednej z nici RNA i destabilizacji dupletu, a w konsekwencji do uwolnienia jednej z nici RNA. Hydrolyza ATP pozwala w tym przypadku na uwolnienie drugiej z nici RNA i oddysocjowanie białka. Mechanizm ten został opisany dzięki poznaniu struktury krystalograficznej helikazy Vasa związanej z ssRNA i analogiem ATP, który nie ulega hydrolyzie (76). Ponadto, helikazy DEAD-box zdolne są do zmiany struktury i kompozycji kompleksów RNA-białko. Poprzez zmianę struktury RNA, helikazy DEAD-box odsłaniają miejsca wiązania dla innych białek. Mogą one również same stanowić platformę dla wiązania kolejnych białek do RNA. Powszechnie wiadomo, że helikaza eIF4AIII działa jak platforma dla złożenia wieloskładnikowego kompleksu EJC (ang. *exon junction complex*) powyżej połączenia egzon-egzon w mRNA (77). Dodatkowo, działając jako białka opiekuńcze RNA, helikazy DEAD-box ułatwiają zwijanie RNA i promują tworzenie struktur trzeciorzędowych RNA. Pokazano, że drożdżowa helikaza Mss116p jest zaangażowana w splicing intronów grupy II. Białko to ma zdolność do lokalnego rozplatania dsRNA, które pozwala na przekształcenie niefunkcjonalnej struktury RNA w funkcjonalną strukturę RNA (78).

1.6. Funkcja ludzkich homologów DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie miRNA

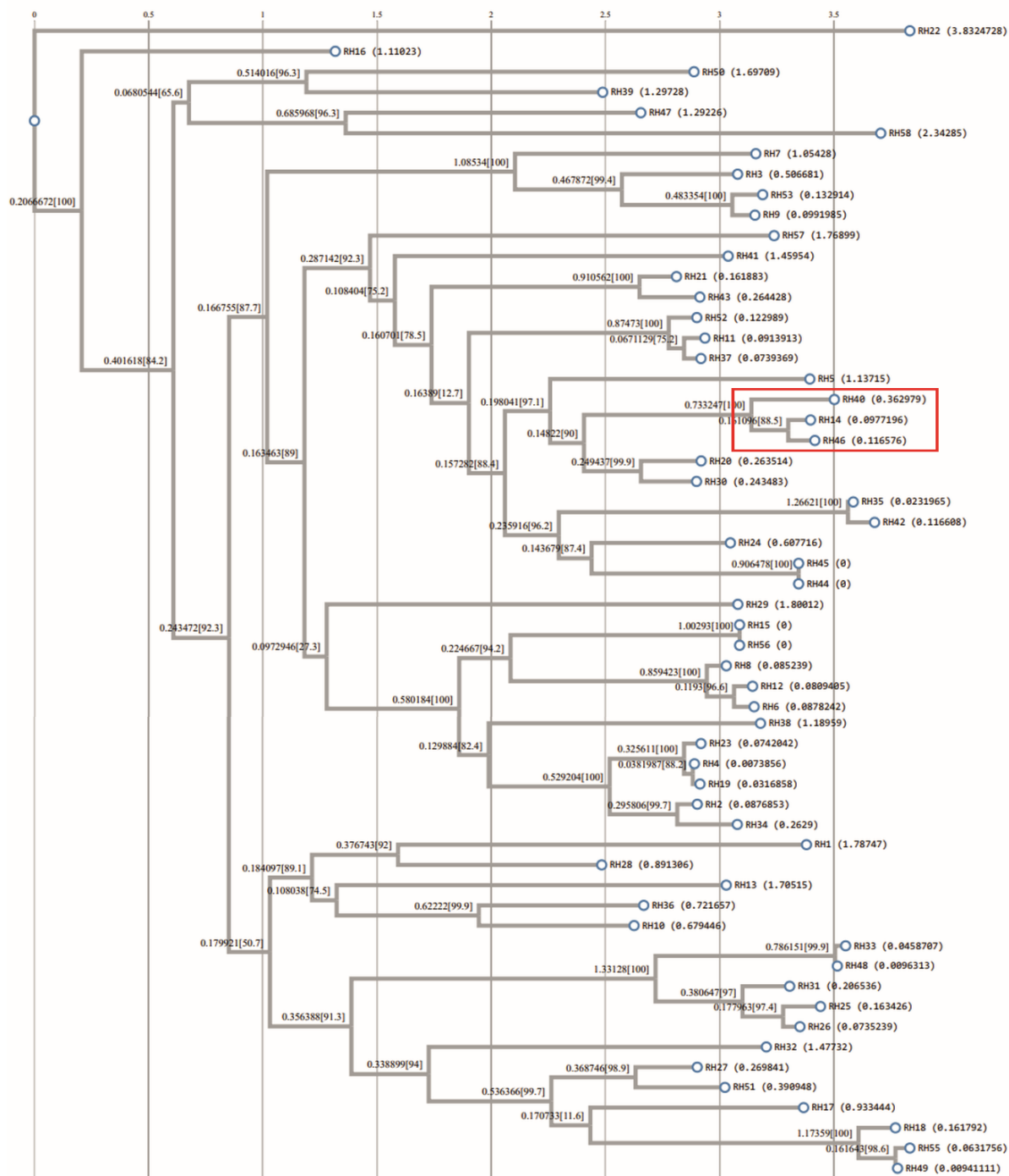
Białka DDX5 i DDX17 wykazują wysokie podobieństwo do DRH1, RH46 oraz RH40 występujących u *Arabidopsis*. Obie te helikazy są zaangażowane w transkrypcję, splicing konstytutywny i alternatywny, eksport mRNA, szlak NMD (ang. *nonsense-mediated decay*) i biogenezę miRNA (79). W komórkach ludzkich, DDX5 i DDX17 są zasocjowane z białkiem Drosha i stanowią czynnik niezbędny dla prawidłowego dojrzewania części pri-miRNA. Promują one biogenezę niektórych miRNA w odpowiedzi na czynniki wzrostu poprzez pośredniczenie w oddziaływaniu Drosha z białkami SMAD, które uczestniczą w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki po pobudzeniu receptora TGF- β (transformujący czynnik wzrostu beta) (80,81). Podobnie DDX5 i DDX17 pośredniczą w oddziaływaniu czynnika transkrypcyjnego p53 z Drosha, ułatwiając przetwarzanie miR16-1 oraz miR143 (82). W obu tych przypadkach białka DDX5/DDX17 wzmacniają obróbkę pri-miRNA. Ponadto, DDX17 podwyższa poziom Ago2 na poziomie potranskrypcyjnym. Poprzez regulowanie poziomów niektórych miRNA, DDX17 stabilizuje Ago2. Obniżenie poziomu DDX17 prowadzi do obniżenia poziomu części miRNA, co z kolei skutkuje zwiększeniem poziomu niezaladowanego Ago2, który ulega degradacji (83). Co więcej, wykazano, że różne części helikazy DDX17 wykazują odmienną specyficzność RNA:

odcinek C-końcowy wykazuje wysokie powinowactwo do jednoniciowych RNA, niezależnie od ich sekwencji, podczas gdy część ATPazowa rdzenia wykazuje specyficzność dla sekwencji zawierających motyw RCAYCH (R – puryna (A/G), Y – pirymidyna (T/C), H: A/T/C). Ponadto, zdolność rdzenia białka DDX17 do rozpoznawania specyficznych sekwencji w pri-miRNA jest ważna dla remodelowania regionu flankującego w pri-miRNA od strony 3' spinę zawierającą miRNA, co zwiększa efektywność procesowania prekursora przez białko Drosha (84). Dodatkowo, DDX5 jest zaangażowane w rozplatanie dupletu miRNA/miRNA* let-7 i jego ładowanie na kompleks RISC (85).

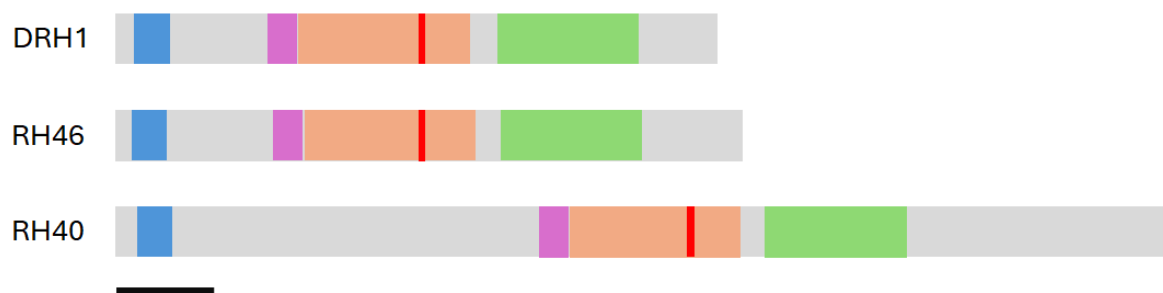
1.7. Charakterystyka roślinnych helikaz DRH1, RH46 i RH40

DRH1, RH46 i RH40 są blisko spokrewnionymi ze sobą helikazami (ryc. 5). Ulegają ekspresji we wszystkich tkankach roślinnych. Najwyższej ekspresji ulega DRH1, co jest związane z obecnością dwóch sekwencji regulatorowych w obrębie genu - intronu w 5' UTR oraz sekwencji TATA w regionie promotora. Najniższy poziom transkryptów cechuje natomiast RH46, którego gen nie posiada intronu w 5' UTR, ani sekwencji TATA w promotorze. Gen kodujący helikazę RH40 posiada natomiast jedynie intron w 5' UTR (86). W budowie DRH1, RH46 i RH40 wyróżnić można typowe dla helikaz DEAD-box elementy: konserwatywny rdzeń oraz wysoce zmienne fragmenty C- i N-końcowe. Ponadto, DRH1, RH46 i RH40, jako jedyne spośród 58 helikaz DEAD-box kodowanych w genomie *Arabidopsis*, zawierają domenę WW (ryc. 6). Domena WW to niewielka, składająca się z 38-40 aminokwasów domena zaangażowana w tworzenie oddziaływań typu białko-białko (87,88). Nazwa domeny odnosi się do dwóch wysoce konserwatywnych tryptofanów (W) rozdzielonych 20-22 innymi aminokwasami (89). W 2009, Kang i współpracownicy przeanalizowali genom *Arabidopsis* w celu znalezienia białek zasocjowanych z fosforylowaną domeną CTD RNA polimerazy II. Używając metod *in silico* szukali homologów zwierzęcych i drożdżowych białek wiążących domenę CTD RNAPII u *Arabidopsis*. Ich analizy wskazały DRH1, RH46 oraz RH40 jako białka zasocjowane z domeną CTD RNAPII za pomocą obecnych w ich strukturze domen WW (90). DRH1, RH46 i RH40 są słabo zbadanymi białkami. Wiadomo, że DRH1 i RH46 są zlokalizowane w jądrze komórkowym i jąderku (91). Najwięcej opublikowanych danych dotyczy helikazy DRH1. Wykazano, że DRH1 jest ATP/dATP-zależną RNA helikazą, a także indukowaną przez jednoniciowe DNA i RNA ATP-azą (92). Helikaza DRH1 jest zaangażowana w kontrolowanie kierowanej przez BRI1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1) i BAK1-LIKE1 (BKK1) śmierci komórki. Podwójne mutanty *bak1 bkk1* wykazują zależną od kwasu

salicylowego śmierć komórek. Co ciekawe, wprowadzenie dodatkowej mutacji w gen kodujący helikazę DRH1 w tło *bak1 bkk1* hamuje zamieranie komórek. Pokazano, że u mutantów *drh1* dochodzi do akumulacji mRNA w jądrze komórkowym, a samo DRH1 oddziałuje z białkami kompleksu pora jądrowego NUP107-160. Możliwym jest zatem, że DRH1 reguluje transport do cytoplazmy mRNA pośrednio regulujących produkcję kwasu salicylowego, którego nadmiar powoduje śmierć komórkową (93). Dodatkowo, wykazano, że DRH1 oddziałuje z UP FRAMESHIFT1 (UPF1), czynnikiem kluczowym dla NMD (ang. *nonsense-mediated decay*), czyli ścieżki specjalizującej się w usuwaniu cząsteczek RNA zawierających przedwczesny kodon STOP. U mutantów *drh1* zaobserwowano natomiast obniżony poziom cząsteczek docelowych NMD, co sugeruje, że DRH1 może być czynnikiem limitującym degradację niektórych targetów tej ścieżki (94). Ponadto, brak DRH1 prowadzi do podwyższenia poziomów 27S-A2 oraz 27S-A3 pre-rRNA, w porównaniu do roślin typu dzikiego. Wynik ten sugeruje udział DRH1 we wczesnych etapach biogenezy rRNA (91).



Rycina 5. Drzewo filogenetyczne helikaz z rodziny DEAD-box. Czerwoną ramką zaznaczono helikazy DRH1 (RH14), RH46 i RH40.



Rycina 6. Struktura helikaz DRH1, RH46 i RH40. Poszczególne domeny i motywy oznaczono kolorami: niebieski – domena WW; różowy – motyw Q; pomarańczowy – domena wiążąca ATP; czerwony – motyw DEAD; zielony – domena C-końcowa. Skala = 100 aa.

2. Cel naukowy rozprawy

Głównym celem pracy było opisanie roli helikaz RNA DRH1, RH46 i RH40 w powstawaniu miRNA u roślin. Białka te należą do rodziny helikaz typu DEAD-box, posiadających domenę WW, która, jak sugeruje się w literaturze, może być odpowiedzialna za oddziaływanie posiadających ją białek z domeną CTD polimerazy RNA II (RNAP II). W ramach pracy postanowiono zbadać wpływ badanych helikaz na strukturę drugorzędową wybranych prekursorów miRNA i określić, czy można zauważyć zależność poziomu danego miRNA od zmian struktury przestrzennej jego prekursora.

Cel został podzielony na kilka szczegółowych zadań:

1. Otrzymanie roślin *A. thaliana* pozbawionych helikaz RNA DRH1, RH46 i RH40 i scharakteryzowanie fenotypu uzyskanego mutantu.
2. Potwierdzenie bezpośredniego oddziaływania DRH1, RH46 i RH40 z białkiem SERRATE (SE). Zbadanie molekularnych interakcji z polimerazą RNA II (RNAP II) wybranego przedstawiciela badanych helikaz.
3. Opisanie wpływu braku badanych helikaz na akumulację miRNA.
4. Scharakteryzowanie udziału helikaz z rodziny DEAD-box w formowaniu odpowiedniej struktury drugorzędowej wybranych prekursorów miRNA (pri-miRNA).
5. Poznanie białek, które tworzą z wybranym przedstawicielem badanych helikaz kompleksy, w celu identyfikacji nowych procesów wymagających aktywności DRH1, RH46 i RH40.

3. Materiały

3.1. Wektory

pENTR/D-TOPO – wektor użyty do klonowania sekwencji kodujących

- działa w systemie Gateway, który umożliwia przeniesienie sekwencji kodujących do wektorów docelowych;
- posiada miejsca restrykcyjne dla enzymów NotI oraz AscI, pozwalające na łatwe wklonowanie sekwencji badanych;
- posiada gen oporności na kanamycynę.

pSU – wektory użyte do mikroskopii konfokalnej

- posiada sekwencję kodującą odpowiednie białka fluorescencyjne (EGFP lub tRFP) na końcu aminowym (pSU3') lub karboksylowym (pSU5');
- posiada promotor ubikwityny 10 (UBQ) Arabidopsis;
- posiada gen oporności na ampicylinę;
- zawiera miejsce rozpoznawane przez topoisomerazę I systemu TOPO pozwalającą na przeklonowanie sekwencji badanej z wektora pENTR/D-TOPO.

pUB – wektor użyty do transformacji roślin poddany modyfikacjom

- zawiera promotor ubikwityny 10 (UBQ10) Arabidopsis;
- posiada gen kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP) na końcu aminowym (pUBN), który służy jako etykieta;
- posiada modyfikację polegającą na wprowadzeniu markera selekcyjnego składającego się z sekwencji kodującej oleozynę OLE1 w fuzji z białkiem czerwonej fluorescencji (tRFP) pod kontrolą promotora OLE1.

3.2. Materiał roślinny

Wszystkie rośliny użyte do realizacji projektu, którego wyniki opisano w niniejszej pracy to *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia-0 (Col-0).

- rośliny typu dzikiego (wt)

- *drh1-1* (SALK_063362) – rośliny z insercją T-DNA w genie kodującym białko DRH1 (AT3G01540).
- *rh46-1* (SALK_068359) – rośliny z insercją T-DNA w genie kodującym białko RH46 (AT5G14610).
- *rh40-1* (SALK_056041) – rośliny z insercją T-DNA w genie kodującym białko RH40 (AT3G06480).
- podwójne mutanty *drh1-1 rh46-1*, *drh1-1 rh40-1*, *rh46-1 rh40-1* uzyskane przez krzyżowanie pojedynczych mutantów.
- potrójny mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* uzyskany przez krzyżowanie podwójnego mutantu *drh1-1 rh40-1* z pojedynczym mutantem *rh46-1*.
- GFP-DRH1 - rośliny transgeniczne z wprowadzonym genem kodującym białko fuzyjne składające się z białka GFP przyłączonego do końca aminowego białka DRH1 w tło mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Gen kodujący białko fuzyjne jest pod kontrolą promotora ubikwityny 10 Arabidopsis.

3.3. Materiały do hodowli roślin

- krążki torfowe Jiffy-7 42 mm (Jiffy International AS)
- środek grzybobójczy Amistar
- pożywka ½ Murashige & Skoog (MS)

0,22% koncentrat MS

1,5% sacharoza

Dopełniono wodą destylowaną do objętości końcowej. pH roztworu doprowadzono przy użyciu 1M KOH do wartości 5,5-5,6. Następnie dodano 0,8g agaru na 100ml pożywki i autoklawowano. Pożywkę wylano na kwadratowe szalki Petriego o wymiarach 100x100x20mm (Sarstedt).

3.4. Materiały do pracy z bakteriami

Pożywka LB do hodowli bakterii:

1%	Biotrypton
0.5%	ekstrakt drożdżowy
1%	NaCl

W przypadku pożywki stałej przed autoklawowaniem pożywki dodawano również agar o stężeniu końcowym 1,5%.

Stężenie końcowe używanych antybiotyków:

Ampicylina	100µg/ml
Kanamycyna	50µg/ml
Rifampicyna	100µg/ml
Streptomycyna	100µg/ml
Spektynomycyna	100µg/ml

3.5. Odczynniki użyte podczas pracy z białkami

Bufor lizujący użyty podczas koimmunoprecypitacji:

50 mM	Tris-HCl pH 8,0
150 mM	NaCl
1%	Triton X-100

Bufor płuczący użyty podczas koimmunoprecypitacji:

20 mM	Tris-HCl pH7,5
0,1%	Triton X-100

Roztwór do przygotowania żelu zagęszczającego (5% żel poliakryloamidowy)

5%	akrylamid (stosunek akrylamidu do bis-akrylamidu 30:0,8)
125 mM	Tris-HCl pH 6,8 (Sigma Merck)

0,1% SDS

0,05% APS

0,1% TEMED

Roztwór do przygotowania żelu rozdzielającego (żel poliakryloamidowy)

5-15% akrylamid (stosunek akrylamidu do bis-akrylamidu 30:0,8)

368 mM Tris-HCl pH 8,6

0,1% SDS

0,05% APS

0,1% TEMED

Bufor do elektroforezy białek w żelu poliakryloamidowym (bufor 1xLaemmli)

25 mM Tris

192 mM glicyna

0,1% SDS

Bufor do transferu półsuchego

25mM Tris

51mM glicyna

0,1% SDS

Bufor obciążający do białek (2 x stężony):

125mM Tris-HCl pH 6,8

20% glicerol

2% β -merkaptoetanol

0,02% błękit bromofenolowy

4% SDS

Bufor TBST:

20mM Tris-HCl pH 7,5

150mM NaCl

0,2% Tween 20

3.6. Bufory używane do transfekcji protoplastów

Roztwór enzymatyczny do trawienia ścian komórkowych:

1,2% celulaza (Celulaza Onozuka R10 z *Trichoderma viride*)

0,4% macerozym (Macerozym R10 z *Rhizopus* sp.)

400mM mannitol

20mM KCl

20mM MES pH 5,7

Bufor W5:

154mM NaCl

125mM CaCl₂

5mM KCl

Bufor MMg:

400mM mannitol

15mM MgCl₂

4mM MES pH 5,7

Roztwór PEG:

40% PEG3350

200mM mannitol

100mM CaCl₂

Bufor W1:

500mM mannitol

20mM KCl

4mM MES pH 5,7

3.7. Bufory do pracy z DNA i RNA

Bufor 1x TBE (pH 8,3)

89mM Tris

2mM EDTA

89mM kwas borowy

Żel agarozowy (1-2%) do elektroforezy DNA i RNA

1-2%(w/v) agarozą

1x bufor TBE

Bufor 0,5x TBE

44,5mM Tris

1mM EDTA

44,5mM kwas borowy

3.8. Bufory wykorzystane do frakcjonowania

Bufor lizujący

20mM HEPES pH 7,5

20mM KCl

2,5mM MgCl₂

25% glicerol

250mM sacharoza

5mM DTT

40U/ml RNasin

Bufor zawieszający

20mM HEPES

25% glicerol

2,5mM MgCl₂

0,2% Triton X-100

20U/ml RNasin

3.9. Lista zastosowanych oligonukleotydów

Oligonukleotydy służące do genotypowania mutantów insercyjnych		
Cel	Nazwa	Sekwencja
genotypowanie mutanta <i>drh1-1</i>	F_DRH1	CAGGTTTGAGGGGTTCTAAG
	R_DRH1	AGGGAATCTCAAAGCTCGAG
genotypowanie mutanta <i>rh46-1</i>	F_RH46	TGAGTAATGGACTTGTTTCGCC
	R_RH46	TTGCAAATACTGGAGGGTTTG
genotypowanie mutanta <i>rh40-1</i>	F_RH40	GCCTCATTTTGTCACATCTCC
	R_RH40	GCCTCATTTTGTCACATCTCC

uniwersalny starter	SALK	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
SALK		

Oligonukleotydy służące do przygotowania konstruktów do analizy FRET-FLIM		
Cel	Nazwa	Sekwencja
amplifikacja sekwencji kodującej domenę CTD RNAPII	F_CTD_NotI	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATATAGTCCATCATCGCCTGGA
	R_CTD_AscI	TTGGCGCGCCGTTAACCCGTTGATGACGGTGA
amplifikacja sekwencji kodującej DRH1 bez domeny WW (DRH1 59-619aa)	F_51DRH1_NotI	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATCTCTACCTCCTAAGTTTTCTCCC
	R_51DRH1_AscI	TTGGCGCGCCTTTTCATCTGTGTTTCATCATCATC
		G

Oligonukleotydy służące do PCR kolonijnego oraz sekwencjonowania Sangera		
cel	Nazwa	Sekwencja
startery dla wektora pENTR	F_pENTR	GTTTTCCCAGTCACGACGTT
	R_pENTR	ACGACTCACTATAGGGGATATCAG
startery uniwersalne dla wektorów zawierających GFP (komplementarne do sekwencji kodującej GFP)	F_GFP	GCATCGACTTCAAGGAGGAC
	R_GFP	GTCCTCCTTGAAGTCGATGC
starter uniwersalny dla wektorów zawierających terminator 35S (komplementarny do sekwencji terminatora 35S)	R_35S	GCTCAACACATGAGCGAAAC

starter uniwersalny dla wektorów zawierających promotor ubikwityny 10 (starter komplementarny do sekwencji promotora ubikwityny 10)	F_UBQ	CGATTTTCTGGGTTTGATCG
startery komplementarne do sekwencji kodującej DRH1	F2_DRH1	GTGGCGACTCTGGTTATGGT
	R2_DRH1	CGGTTCTTGTAGCAACCGATG
startery komplementarne do sekwencji kodującej RH46	F2_RH46	TGGTCTTCCCAATGAGCTTC
	R2_RH46	GGACGAGGCAGATAGAATGC
startery komplementarne do sekwencji kodującej RH40	F2_RH40	CAGCAGCTGAGCCATCAGTA
	R2_RH40	ATGTCCACCGTATTGGGAGA

Oligonukleotydy użyte do analizy struktury drugorzędowej za pomocą DMS-MaPseq		
Cel	Nazwa	Sekwencja (5'→3')
Amplifikacja sekwencji pre-miR399d	F_pre-miR399d	GTCCAACCTTCCAATAACTCAAATGCA
	R_pre-miR399d	ACCAAGAAATATAACCATAAATTGCCTAGAG
Amplifikacja sekwencji pre-miR399c	F_pre-miR399c	AAACCAACATTGAAAGAGGAAGTTACGA
	R_pre-miR399c	AGGATTGATATTAGCAGAACCGGT
Amplifikacja sekwencji pre-miR398b	F_pre-miR398b	TGTCTGTGTATTTATAGTTTCCAGCA
	R_pre-miR398b	TGACGAATTTACATAGAACTTACACCA
Amplifikacja sekwencji pre-miR398c	F_pre-miR398c	CTCTCAGCAGATTTGAAGGATATCGA
	R_pre-miR398c	TGGTAAATGAATAGAAGCCACGGG
	F_pre-miR408	AAACCCTAAGAAATAACACAAACACAAAGG

Amplifikacja sekwencji pre-miR408	R_pre-miR408	AAAACCCTTAAGCTTGTCGTCAGC
Amplifikacja sekwencji pre-miR834	F_pre-miR834	TCTGATTGTGAGGATAAAGGTTTCGT
	R_pre-miR834	AACCAGACTTCAATCCTCGACCT
Amplifikacja sekwencji pre-miR2111a	F_pre-miR2111a	GAACTTGC GCGCATTATGGG
	R_pre-miR2111a	AGGATCAAAACCAACCTCTAGATGA
Amplifikacja sekwencji pre-miR-2112	F_pre-miR2112	ATCTCCTCTTGCGCTCTCTC
	R_pre-miR2112	TGCCAGGTTCAAGCGATTTTG
Amplifikacja sekwencji pre-miR3434	F_pre-miR3434	AAGGTTGTACATTCTCGCTTCCCAT
	R_pre-miR3434	CAGCATGTGTAGCAAGGTAGTAACT
Amplifikacja sekwencji pre-miR5656	F_pre-miR5656	CTGTCCTTGCGCACTTTCTTTG
	R_pre-miR5656	CCTTCAAGTTGTCCTAGCGCATCT
Amplifikacja sekwencji pre-miR3932b	F_pre-miR3932b	TCACCTGATCAAGATTTGGCATTGC
	R_pre-miR3932b	CAAGATTCGGCATTGTCTTCAGAAA
Amplifikacja sekwencji pre-miR5996	F_pre-miR5996	TGGTCACACGAAACAAGGTTGA
	R_pre-miR5996	ACGGTCACTGAATAAGGTTAAGT
Amplifikacja sekwencji pre-miR841b	F_pre-miR841	GGATCACACCTCCTCCAACAATT
	R_pre-miR841	AGACTACTCTTTATCCACCAATTGTTC

Amplifikacja sekwencji pre-miR822	F_pre-miR822	TGTGATACTCGTGATTGGAATAACA
	R_pre-miR822	CATAGATGAAACCACTGCTCTCAAG
Amplifikacja sekwencji pre-miR827	F_pre-miR827	TGTACTIONTGCACAACCTTAAACTTGT
	R_pre-miR827	TCTTGAGCTGCTTTGAGGACA
Amplifikacja sekwencji kodującej UBQ4 (kontrola)	F_UBQ4	TACTCTTGAGGTTGAGAGCTCAGACAC
	R_UBQ4	ATAAGTTTTTCCC GCAGACCGAAGCAG

3.10. Lista odczynników, roztworów i zestawów gotowych

Zestawy odczynników gotowych

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit	ThermoFisher Scientific
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	ThermoFisher Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific
High Sensitivity DNA Kit	Agilent
NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina	New England Biolabs
NEBNext Ultra II FS DNA PCR-free Kit for Illumina	New England Biolabs
NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit v3	Perkin Elmer
Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit	ThermoFisher Scientific
RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq	ThermoFisher Scientific
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
μMACS GFP Isolation Kit	Miltenyi Biotec

Enzymy

CloneAmp HiFi PCR Premix	TaKaRa Bio
--------------------------	------------

DNaza Turbo (2U/ μ l)	Ambion
Enzymy restrykcyjne Fast Digest	ThermoFisher Scientific
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	ThermoFisher Scientific
GoTaq qPCR Master Mix	Promega
Induro Reverse Transcriptase	New England Biolabs
Inhibitor rybonukleaz RNasin	Promega
Inhibitor proteaz Complete Mini EDTA-free	Roche
NEBNext dsDNA Fragmentase	New England Biolabs
Odwrotna transkryptaza Super Script III (20U/ μ l)	Invitrogen
Phire Plant Direct PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific
Phire Hot Start II DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific
Polimeraza DNA DreamTaq (5U/ μ l)	ThermoFisher Scientific

Odczynniki

1,4-Ditiotreitol (DTT)	Carl Roth
Agar	Duchefa
Agaroza	Prona
Akrylamid	Sigma Aldrich
Amersham Hybond-NX	GE Healthcare
Amistar	Syngenta
Antybiotyki	Bioshop
Biotrypton	Bioshop
Bibuła Whatman 3MM	GE Healthcare
Błękit bromofenolowy	Sigma Aldrich
Bromek etydyny	Bio-Rad
β -merkaptoetanol	Sigma Aldrich

Chlorek magnezu	Merck
Chlorek potasu	Merck
Chlorek sodu	Sigma Aldrich
Chlorek wapnia	Sigma Aldrich
Chloroform	Chempur
Dietylopirowęglan (DEPC)	Promega
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	USB
EDTA	Sigma Aldrich
Etanol 96%	POH Gliwice
Ekstrakt drożdżowy	Difco Laboratories
Glicerol	Sigma Aldrich
Glicyna	Sigma Aldrich
HEPES	Sigma Aldrich
Izopropanol	Chempur
Koncentrat Murashige & Skoog (MS)	Duchefa
Kwas borowy	Sigma Aldrich
Kwas solny	POCH Gliwice
Kwas 2-morfolinoetylosulfonowy (MES)	Sigma Aldrich
Mannitol	Prolabo
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich
Octan sodu	Sigma Aldrich
PEG 3350	Sigma Aldrich
Sacharoza	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris	Sigma Aldrich
Triton X-100	USB

Tween 20

Sigma Aldrich

Wodorotlenek potasu

Sigma Aldrich

Markery molekularne

Gene Ruler 100bp Plus

ThermoFisher Scientific

PageRuler Prestained

ThermoFisher Scientific

4. Metody

4.1. Hodowla roślin

Rośliny hodowano na krążkach torfowych Jiffy-7 42mm (Jiffy International AS) lub pożywkach ½ MS. Krążki torfowe namaczano w wodzie, a następnie spryskano środkiem przeciwwgrzybiczym Amistar firmy Syngenta. Na krążki torfowe naniesiono nasiona, które następnie poddano stratyfikacji polegającej na umieszczeniu krążków torfowych w temperaturze 4°C bez dostępu światła na trzy dni. Po tym czasie rośliny hodowano w fitotronie SANYO lub komorze hodowlanej Conviron w warunkach dnia długiego.

Warunki hodowli panujące podczas uprawy:

- cykl dobowy: 16 godzin światła i osiem godzin ciemności
- wilgotność 70%
- naświetlenie 150-200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$
- temperatura – zastosowano dwa różne ustawienia temperatury w zależności od celu prowadzenia hodowli:

22°C – genotypowanie i analizowanie fenotypów mutantów insercyjnych, przygotowanie materiału do sekwencjonowania nowej generacji, eksperymenty FRET-FLIM i badanie lokalizacji komórkowej białek i ich kolokalizacji, koimmunoprecypitacja kompleksów białkowych za pomocą systemu μMACS GFP Isolation Kit (Miltenyi Biotec), przygotowanie materiału do analiz struktury drugorzędowej RNA.

16°C – analizy fenotypów mutantów insercyjnych, przygotowanie materiału do sekwencjonowania nowej generacji, przygotowanie materiału do analiz struktury drugorzędowej RNA.

4.2. Przygotowanie konstruktów wykorzystanych w pracy

Jako matrycę do przygotowania konstruktów wykorzystano cDNA uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję z RNA pochodzącego z dwutygodniowych siewek *A.thaliana* typu dzikiego (wt), ekotyp Col-0.

Wklonowanie sekwencji kodujących badane białka do wektora pENTR

Sekwencję kodującą domenę CTD RNAPII amplifikowano z wykorzystaniem mieszaniny reakcyjnej CloneAmp (TaKaRa Bio) oraz starterów specyficznych dla danej sekwencji z dołączonymi miejscami cięć dla enzymów restrykcyjnych. Między sekwencją specyficzną dla amplifikowanej domeny a dołączonym miejscem cięcia dla wybranego enzymu restrykcyjnego (prawy starter – NotI, lewy starter AscI) dodano dodatkowy nukleotyd (może to być dowolny nukleotyd, ale najczęściej stosowano T), w celu zachowania ramki odczytu po przeklonowaniu sekwencji badanej do wektora docelowego (system GATEWAY®).

Po amplifikacji, część mieszaniny reakcyjnej rozdzielono na 1% żelu agarozowym w celu sprawdzenia wydajności reakcji PCR oraz specyficzności uzyskanego produktu. Jeżeli zaobserwowano obecność prążka o pożądanej wielkości to powstały produkt oczyszczono z wykorzystaniem zestawu odczynników gotowych GeneJET Gel Extraction (ThermoFisher Scientific) używając protokołu „General DNA cleanup from enzymatic reactions protocol” dołączonego do zestawu oraz pozostałą część mieszaniny reakcyjnej. Oczyszczony produkt poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi FastDigest™ (NotI i AscI lub jego izoschizomerem SgsI). Po trawieniu enzymami restrykcyjnymi część mieszaniny rozdzielono na 1% żelu agarozowym w celu sprawdzenia czy nie doszło do niepożądanego degradacji DNA. Pozostałą część mieszaniny poddano oczyszczaniu za pomocą GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup (ThermoFisher Scientific) zgodnie z protokołem protokołu „General DNA cleanup from enzymatic reactions protocol” dołączonego do zestawu. Następnie, przeprowadzono ligację produktu do wektora pENTR/D-TOPO, który uprzednio został poddany trawieniu tymi samymi enzymami restrykcyjnymi, których użyto do trawienia produktu reakcji PCR. Do ligacji produktu do wektora pENTR wykorzystano ligazę T4 DNA (ThermoFisher Scientific). Mieszaninę inkubowano trzy godziny w temperaturze pokojowej. Połowę mieszaniny ligacyjnej użyto do transformacji komórek kompetentnych (szczep DH5α bakterii *E. coli*) metodą szoku cieplnego: bakterie inkubowano jedną minutę w 42°C, przełożono na lód, a następnie inkubowano godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 400RPM. Bakterie wysiano na stałe pożywki LB z dodatkiem antybiotyku kanamycyny. W celu zidentyfikowania kolonii efektywnie transformowanych wektorem przeprowadzono PCR kolonijny z użyciem startera komplementarnego do sekwencji wektora oraz startera komplementarnego do sekwencji domeny CTD RNAPII. Bakterie po selekcji namnożono i wykorzystano do izolacji plazmidów z użyciem zestawu odczynników gotowych GeneJET Plasmid Miniprep

(ThermoFisher Scientific). Plazmidy poddano sekwencjonowaniu w celu sprawdzenia prawidłowości powstałego konstruktów. Następnie, wektory z prawidłowo wprowadzonymi sekwencjami użyto do przeniesienia sekwencji badanej domeny do wektorów docelowych do analiz FRET-FLIM (wektory pSU3 i pSU5).

Przygotowanie wektorów do analiz mikroskopowych i transformacji roślin

W celu przygotowania wektorów do transfekcji *A. thaliana*, sekwencje kodujące odpowiednie białka zostały przeniesione z wektora przejściowego pENTR/D-TOPO do odpowiednich wektorów docelowych przy pomocy enzymu klonazy Gateway LR Clonase Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific). Wektory pENTR/D-TOPO zawierające sekwencje kodujące obie izoformy DRH1 oraz białka RH46 i RH40 zostały przygotowane w ramach projektów realizowanych przez studentów studiów magisterskich realizowanych w Zakładzie Ekspresji Genów. Do transfekcji protoplastów wykorzystano zmodyfikowane wektory pSU3 i pSU5. Modyfikacja polegała na zastąpieniu oryginalnego promotora promotorem ubikwityny 10 *A. thaliana*. W pracy wykorzystano wektory zawierające dwa różne białka fluorescencyjne: białko zielonej fluorescencji EGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*) oraz białko czerwonej fluorescencji tagRFP (ang. *tag red fluorescent protein*). Do transformacji roślin użyto modyfikowanych wektorów docelowych pUBN, posiadających etykietę w postaci białka zielonej fluorescencji (GFP). Dodatkowo, pracownicy Zakładu Ekspresji Genów wprowadzili do wektora marker selekcyjny FAST składający się z sekwencji kodującej oleozynę OLE1 w fuzji z tRFP pod kontrolą promotora OLE1. OLE1 w fuzji z tRFP ulega ekspresji tylko w nasionach umożliwiając identyfikację transformowanych nasion za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

W celu przeniesienia sekwencji kodujących badane białka z wektora przejściowego do wektora docelowego zastosowano klonazę Gateway LR Clonase Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) oraz 50-150ng wektora pENTR/D-TOPO i 50-150ng wektora docelowego. Do mieszaniny dodano także bufor Tris-EDTA o pH 8,0. Mieszaninę reakcyjną inkubowano godzinę w temperaturze 30°C. Po zakończonej inkubacji połowę objętości mieszaniny reakcyjnej użyto do transformacji komórek kompetentnych (szczep DH5α bakterii *E. coli*) metodą szoku cieplnego: bakterie inkubowano jedną minutę w 42°C, przełożono na lód, a następnie inkubowano godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 400RPM. Bakterie wysiano na stałe pożywki LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. W celu zidentyfikowania kolonii efektywnie transformowanych pożądanym wektorem

wykonano PCR kolonijny z użyciem startera komplementarnego do sekwencji wektora oraz startera komplementarnego do sekwencji kodującej badane białko. Bakterie zawierające pożądane wektory namnożono, a następnie wyizolowano z nich wektory za pomocą zestawu odczynników gotowych GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific). Plazmidy poddano sekwencjonowaniu w celu sprawdzenia poprawności powstałego konstrukt. Na tym etapie wektory służące do transformacji roślin były gotowe do dalszych eksperymentów. Natomiast wektory służące do transfekcji protoplastów ponownie namnożono, a następnie wyizolowano z nich wektory za pomocą zestawu odczynników gotowych GeneJET Plasmid Maxiprep (ThermoFisher Scientific). Tak przygotowane wektory wykorzystano do transfekcji protoplastów i analizy lokalizacji komórkowej białek, ich kolokalizacji i eksperymentów FRET-FLIM.

4.3. Eksperymenty z wykorzystaniem białek

Ekstrakcja białek z materiału roślinnego

W trakcie realizacji niniejszej pracy, ekstrakcję białek z materiału roślinnego przeprowadzano dwoma metodami: szybką z wykorzystaniem kwiatów, służącą testowaniu poziomu białka w pierwszym pokoleniu tworzonej linii transgenicznej oraz drugą, w której wykorzystuje się dwutygodniowe siewki *A. thaliana*, służącą ostatecznej selekcji linii transgenicznej przed koimmunoprecypitacją.

Ekstrakcja białek z kwiatów

1. Do 50-100mg materiału roślinnego (kwiaty) dodano 300µl buforu obciążającego. Kwiaty roztarto.
2. Roztarty materiał zdenaturowano poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 10 minut.
3. Próby zwirowano w mikrowirówce Mikro 200 R Cooled (Hettich) (5 minut, 4°C, 15000xg).
4. Supernatant przeniesiono do nowej probówki.

Ekstrakcja białek z siewek

1. Do 600mg roztartego uprzednio w ciekłym azocie materiału roślinnego dodano 250µl buforu lizującego.

2. Mieszaninę intensywnie wortexowano, a następnie inkubowano na lodzie przez 3 minuty.
3. Próby zwirowano w mikrowirówce z chłodzeniem Mikro 200 R Cooled (Hettich) (10 minut, 4°C, 14000RPM).
4. Supernatant przeniesiono do nowej probówki i ponownie zwirowano w mikrowirówce z chłodzeniem Mikro 200 R Cooled (Hettich) (10 minut, 4°C, 14000RPM). Wirowanie powtarzano do czasu otrzymania czystego supernatantu bez żadnych precypitatów.
5. Do prób dodano buforu obciążającego i inkubowano 10 minut w 95°C.

Elektroforeza białek w denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Elektroforezę białkową prowadzono w buforze 1x Laemmli przez około godzinę przy stałym napięciu elektrycznym 75V, a następnie około godzinę przy stałym napięciu elektrycznym 150V.

Transfer półsuchy białek z żelu poliakrylamidowego na membranę PVDF

1. Przygotowano sześć kawałków bibuły Whatman 3mm oraz jeden kawałek membrany PVDF (Hybond® P, GE Healthcare), których wielkości dopasowano do rozmiaru żelu.
2. Trzy kawałki bibuły Whatman zanurzone w buforze do transferu półsuchego i ułożono je na spodniej części aparatu do transferu półsuchego.
3. Membranę PVDF zanurzone w metanolu na 1 minutę. Następnie membranę przepłukano w wodzie i zanurzone w buforze do transferu półsuchego.
4. Przygotowaną membranę nałożono na bibuły Whatman umieszczone na aparacie do transferu półsuchego.
5. Żel poliakrylamidowy zanurzone w buforze do transferu półsuchego i położono go na membranę PVDF.
6. Na żel położono trzy kawałki bibuły Whatman zanurzone uprzednio w buforze do transferu półsuchego.
7. Całość przykryto górną częścią aparatu do transferu.
8. Transfer białek na membranę PVDF prowadzono przez godzinę przy napięciu stałym 15V.

Western blot

1. Membranę PVDF z białkami inkubowano w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w proszku (OSM Gostyń) rozpuszczonego w buforze TBS-T przez noc w temperaturze 4°C lub dwie godziny w temperaturze pokojowej.
2. Następnie membranę zalano roztworem 2,5% mleka odtłuszczonego w proszku (OSM Gostyń) rozpuszczonego w buforze TBS-T z przeciwciałami pierwszorzędowymi lub przeciwciałami skoniugowanymi z HRP i inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej.
3. Membranę przepłukano trzy razy po 10 minut w buforze TBS-T.
4. Membranę inkubowaną z przeciwciałami pierwszorzędowymi inkubowano następnie w 2,5% roztworze mleka odtłuszczonego w proszku (OSM Gostyń) rozpuszczonego w buforze TBS-T z przeciwciałami drugorzędowymi.
5. Po inkubacji, membranę przepłukano trzy razy po 10 minut w buforze TBS-T.
6. Na membrany (po inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi lub przeciwciałami skoniugowanymi z HRP) nałożono substrat Amershan ECL Western Blotting Detection Reagents.

Immunoprecypitacja białek w fuzji z GFP

1. Do 600mg rozartego uprzednio w ciekłym azocie materiału roślinnego dodano 1,5ml buforu lizującego i intensywnie zmieszano.
2. Próby inkubowano na lodzie przez 10 minut, ponownie mieszając mieszaninę w połowie inkubacji.
3. Próby zwirowano w wirówce Biofuge Stratos (ThermoFisher Scientific) (rotor wychylny, 10 minut, 4°C, 4500xg).
4. Supernatant przeniesiono do próbówki typu eppendorf o pojemności 2ml.
5. Próby zwirowano w mikrowirówce z chłodzeniem Mikro 200 R Cooled (Hettich) (10 minut, 4°C, 13000RPM).
6. Supernatant przeniesiono do nowej próbówki typu eppendorf o pojemności 2ml.
7. Z supernatantu pobrano 50µl do nowej próbówki typu eppendorf o pojemności 2ml. Do próby dodano buforu obciążającego i inkubowano 5 minut w 95°C. Następnie próbę zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -20°C. Próba ta będzie stanowić kontrolę nałożenia.
8. Do pozostałej części ekstraktu dodano 50µl kulek magnetycznych połączonych z przeciwciałem anti-GFP (MicroBeads, (Miltenyi Biotec)).

9. Całość inkubowano przez 30 minut, obracając próbki powoli na rotatorze SB3 (Stuart) (3-4 RPM).
10. W statywie magnetycznym umieszczono kolumny z zestawu odczynników gotowych (μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kits (Miltenyi Biotec). Kolumny przepłukano 200 μ l buforu lizującego.
11. Po zakończeniu inkubacji, na kolumnę dodano porcjami cały ekstrakt białkowy wymieszany z kulkami magnetycznymi.
12. Następnie, na kolumnę dodano czterokrotnie 200 μ l buforu płuczącego.
13. Po zakończeniu płukań, kolumny przełożono ze statywu magnetycznego do probówek typu Eppendorf o objętości 2ml.
14. Na kolumny nałożono 100 μ l gorącego buforu do elucji (podgrzanego do 95°C) pochodzącego z zestawu odczynników gotowych μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kits (Miltenyi Biotec).
15. Poczekano aż bufor z białkami spłynie do probówki, a następnie resztę buforu usunięto z kolumny przy pomocy tłoczka dołączonego do kolumny.
16. 10% uzyskanego eluatu nałożono na denaturujący żel poliakrylamidowy wraz z wcześniej pobraną i zamrożoną kontrolą nałożenia. Pozostałe 90% eluatu poddano procedurze wytrącania białek przy pomocy TCA.

Precypitacja białek za pomocą kwasu trójchlorooctowego (TCA)

1. Do ekstraktu białkowego dodano 25 μ l 50% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA) i mieszano przez pipetowanie.
2. Do prób dodano 6,25 μ l 10% Tween 20.
3. Próby inkubowano na lodzie przez 30 minut.
4. Próby wirowano w mikrowirówce z chłodzeniem Mikro 200 R Cooled (Hettich) (10 minut, 4°C, maksymalna prędkość). Supernatant usunięto.
5. Osad przepłukano z użyciem 0,5ml 10% zimnego TCA.
6. Próby wirowano w mikrowirówce z chłodzeniem Mikro 200 R Cooled (Hettich) (10 minut, 4°C, maksymalna prędkość). Supernatant usunięto.
7. Osad przepłukano z użyciem 0,5ml zimnego 90% acetonu.
8. Próby wirowano w mikrowirówce z chłodzeniem Mikro 200 R Cooled (Hettich) (10 minut, 4°C, maksymalna prędkość). Supernatant usunięto.
9. Płukanie acetonem i wirowanie powtórzono.

10. Supernatant usunięto, a osad osuszono pozostawiając próby w temperaturze pokojowej.

4.4. Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych

Izolacja RNA

Do izolacji RNA użyto 0,06g (przygotowanie bibliotek do analizy PAT-seq oraz RT-qPCR) lub 0,1g (przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania małych RNA i transkryptomu) roztartej wcześniej w ciekłym azocie tkanki roślinnej (dwutygodniowe siewki). Izolację RNA przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników gotowych Direct-zol™ RNA Mini Prep Kit (Zymo Research) (przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania małych RNA i transkryptomu) lub RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (przygotowanie bibliotek do analizy PAT-seq oraz RT-qPCR) zgodnie z protokołami dołączonymi do wymienionych zestawów. Pozostałości DNA w próbach zostały usunięte przy użyciu Turbo DNazy (ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta.

Przygotowanie cDNA

Do przygotowania cDNA użyto 4µg całkowitego RNA oraz odwrotną transkryptazę Superscript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. Uzyskane cDNA posłużyło jako matryca do reakcji RT-qPCR przeprowadzonej w celu sprawdzenia poziomu pri-miRNA.

Genotypowanie roślin

Genotypowanie roślin przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników gotowych Phire Plant Direct PCR Master Mix (Applied Biosystems ThermoFisher Scientific) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

PCR kolonijny

Sprawdzenie obecności pożądanego plazmidu w koloniach bakteryjnych przeprowadzono za pomocą PCR kolonijnego z użyciem polimerazy DreamTaq (ThermoFisher Scientific) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Kolonię bakteryjną zebrano końcówką do pipet, którą następnie zamoczono w mieszaninie reakcyjnej.

RT-qPCR

Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time quantitative PCR*) został wykorzystany do sprawdzenia poziomów pierwotnych transkryptów miRNA w potrójnym mutancie helikazowym w różnych warunkach temperaturowych. Do analizy użyto PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA

Analiza transkryptomu

RNA został wyizolowany z dwutygodniowych siewek rośliny *A. thaliana*. Z otrzymanego RNA usunięto DNA za pomocą Turbo DNazy (ThermoFisher Scientific). Jakość i integralność uzyskanego RNA zostały sprawdzone za pomocą elektroforezy kapilarnej na mikrochipie, zestawu odczynników gotowych Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies) oraz urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Rybosomalny RNA został usunięty z prób za pomocą RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq (Invitrogen). 100ng przygotowanego w ten sposób RNA wykorzystano do przygotowania bibliotek za pomocą zestawu odczynników gotowych NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

Jakość i integralność przygotowanych bibliotek zostały sprawdzone za pomocą elektroforezy kapilarnej na mikrochipie, zestawu odczynników gotowych Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) oraz urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Stężenie uzyskanych bibliotek sprawdzono z użyciem zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Następnie biblioteki zmieszano w równych molowych proporcjach. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę Fasteris SA zlokalizowaną w Szwajcarii. Sekwencjonowanie wykonano na platformie NovaSeq 6000 (Illumina) (2x100nt).

Sekwencjonowanie małych RNA

RNA został wyizolowany z dwutygodniowych siewek rośliny *A. thaliana*. Jakość i integralność uzyskanego RNA zostały sprawdzone za pomocą elektroforezy kapilarnej na mikrochipie, zestawu odczynników gotowych Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies) oraz urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). 2µg RNA wykorzystano do przygotowania bibliotek za pomocą zestawu odczynników gotowych

NEXTFLEX® Small RNA-Sequencing Kit v3 for Illumina Platforms (PerkinElmer) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

Jakość i integralność przygotowanych bibliotek zostały sprawdzone za pomocą elektroforezy kapilarnej na mikrochipie oraz zestawu odczynników gotowych Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) i urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Stężenie uzyskanych bibliotek sprawdzono z użyciem zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Następnie biblioteki zmieszano w równych molowych proporcjach. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę FASTERIS SA zlokalizowaną w Szwajcarii. Sekwencjonowanie wykonano na platformie NextSeq (1x75nt).

DMS-MaPseq

Przygotowanie materiału roślinnego do przeprowadzenia DMS-MaPseq

1. Dwutygodniowe siewki *A. thaliana* zebrano do falkona o objętości 50ml i dodano 25ml buforu.
2. Do prób dodano 250µl DMS do stężenia końcowego 2%. Do prób kontrolnych dodano wodę.
3. Siewki inkubowano przez 30 minut.
4. Po inkubacji do prób dodano β-merkaptotanol do stężenia końcowego 20%.
5. Próby inkubowano 5 minut.
6. Materiał przepłukano wodą destylowaną, a następnie osuszono za pomocą ręczników papierowych i zamrożono w ciekłym azocie.
7. Zamrożony materiał roztarto w mrożeniu.

Celowany DMS-MaPseq

1. Do 0,3g tkanki roślinnej roztartej uprzednio w ciekłym azocie dodano 4ml zimnego buforu lizującego.
2. Próby przefiltrowano przez jedną warstwę Miracloth.
3. Próby zwirowano w wirówce Biofuge Stratos (ThermoFisher Scientific) (rotor wychylony, 10 minut, 4°C, 1500xg).
4. Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 4ml zimnego buforu zawieszającego.

5. Próby zwirowano w wirówce Biofuge Stratos (ThermoFisher Scientific) (rotor wychylony, 10 minut, 4°C, 1500xg).
6. Punkty 4. i 5. Powtórzono dwukrotnie.
7. Osad zawieszono w 450µl buforu RLT z zestawu odczynników gotowych RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).
8. Wyizolowano RNA za pomocą zestawu odczynników gotowych RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) postępując według protokołu dołączonego do zestawu.
9. Wyizolowane RNA poddano trawieniu DNazą według tabeli:

RNA	25µl
10x Reaction Buffer (Invitrogen)	3µl
Turbo DNase (Invitrogen)	1µl
RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega)	1µl
Objętość końcowa	30µl

10. Próby inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C.
11. RNA oczyszczono za pomocą zestawu odczynników gotowych RNeasy Mini Kit (Qiagen) postępując zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu i zmierzono ich stężenia.
12. Do 5µg RNA dodano 2µl starterów specyficznych dla wyselekcjonowanych pre-miRNA, 1µl 10mM dNTP i wody do objętości 10µl.
13. Próby inkubowano 5min w temperaturze 65°C, a następnie przełożono je na lód.
14. Do mieszaniny dodano 5µl 5x Induro RT Reaction Buffer (NEB), 0,2µl RNase Inhibitor (Promega) oraz 4,8µl wody.
15. Próby inkubowano 30 minut w temperaturze 55°C, a następnie w temperaturze 95°C przez 1 minutę.
16. Przygotowane cDNA użyto jako matrycę do reakcji PCR, by amplifikować wyselekcjonowane pre-miRNA zgodnie z tabelą:

5x Phire Reaction Buffer (Thermo Scientific)	5 µl
4x 2,5mM dNTPs	2 µl

Lewy starter	1 μ l
Prawy starter	1 μ l
Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)	0,5 μ l
Water	14,5 μ l (zależne od objętości dodanego cDNA)
cDNA	1 μ l (zmienne, zależne od poziomu ekspresji amplifikowanego pre-miRNA)
Objętość końcowa	25 μ l

17. Reakcje przeprowadzono zgodnie z tabelą:

Denaturacja wstępna	98°C	3min	x1
Denaturacja	98°C	15sek	x35
Przyłączenie starterów	60°C	15sek	
Elongacja	72°C	30sek	
Elongacja końcowa	72°C	1min	x1

18. Próby oczyszczono za pomocą zestawu odczynników gotowych GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro kit (Thermo Scientific) postępując zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

19. Oczyszczone produkty PCR pofragmentowano używając dsDNA Fragmentase (NEB) przygotowując próby zgodnie z tabelą:

DNA (500ng)	1-16 μ l
10x Fragmentase Reaction Buffer v2	2 μ l
Woda	zmienne, zależnie od objętości dodanego DNA

dsDNA Fragmentase	2 μ l
Finale volume	20 μ l

20. Próby inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C.
21. Pod koniec inkubacji do prób dodano 1 μ l 1M DTT. Następnie próby inkubowano 15 minut w temperaturze 65°C.
22. Pofragmentowane produkty PCR użyto do przygotowania bibliotek DNA za pomocą zestawu odczynników gotowych NEBNext Ultra II FS DNA PCR-free Library kit for Illumina postępując zgodnie z protokołem producenta.
23. Sekwencjonowanie bibliotek zostało przeprowadzone przez firmę Macrogen Europe B.V. zlokalizowaną w Holandii. Sekwencjonowanie wykonano na platformie NovaSeqX (1x150nt).

4.5. Eksperymenty z wykorzystaniem mikroskopii

Izolacja i transfekcja protoplastów z liści *Arabidopsis thaliana*

1. Na paski taśmy klejącej przyklejono średniej wielkości liście rozety 3-tygodniowych roślin *A. thaliana*.
2. Na każdy tak przygotowany pasek taśmy przyklejono drugi i delikatnie dociśnięto palcem liście do warstw taśmy klejącej. Następnie oderwano jedną warstwę taśmy klejącej wraz z warstwą dolnej epidermy. Tak przygotowane liście przymocowano do dna szalki Petriego o średnicy 90mm, stroną bez epidermy skierowaną ku górze.
3. Szalkę zalano roztworem enzymatycznym przeznaczonym do trawienia ścian komórkowych i wytrząsano przez 30-45 minut w temperaturze pokojowej.
4. Paski taśmy opłukano z pozostałości liści i usunięto z szalki. Zawiesinę inkubowano w tych samych warunkach przez kolejne 15 minut.
5. Całość zawiesiny przeniesiono do probówki typu Falcon o pojemności 50ml i wirowano 5 minut w wirówce Biofuge Stratos (ThermoFisher Scientific) z przyspieszeniem 150xg.
6. Protoplasty trzykrotnie przepłukano 15ml buforu W5. Po każdorazowym dodaniu buforu W5 protoplasty zawieszono przez delikatne kołysanie i obracanie probówki w dłoniach. Zawieszono protoplasty wirowano 5 minut w wirówce Biofuge Stratos

- (ThermoFisher Scientific) z przyspieszeniem 150xg. Po ostatnim płukaniu supernatant usunięto a protoplasty zawieszono w 1ml buforu MMg.
7. Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2ml (z okrągłym dnem), dodano po 5µg plazmidu (badanie lokalizacji) lub odpowiedniej mieszaniny plazmidów (eksperymenty typu FRET-FLIM), a następnie, przy pomocy ściętego tipsa, dodano po 110µl zawiesiny protoplastów w buforze MMg. Odczekano 10 minut, aż wszystkie protoplasty opadną na dno probówek.
 8. Następnie do wszystkich probówek dodano po 110µl roztworu PEG, w piętnastosekundowych odstępach czasu. Po dodaniu PEGu wymieszano mieszaninę poprzez delikatne uderzenie palcem w ściankę probówki. Po upływie 6 minut dodano po 450µl buforu W5, w tej samej kolejności co roztwór PEG, również w piętnastosekundowych odstępach.
 9. Protoplasty zwirowano 3 minuty w mikrowirówce Mikro 200 R (Hettich) z przyspieszeniem 300xg. Supernatant odciągnij, a protoplasty zawieś w 300µl buforu W1.
 10. Protoplasty pozostawiono pod przykryciem w całkowitej ciemności w pozycji leżącej, do czasu wykonania eksperymentu (od 10 do 16 godzin).

Mikroskopia konfokalna

Mikroskop konfokalny był wykorzystywany w celu wstępnego określenia lokalizacji badanych białek w komórce oraz selekcji protoplastów do eksperymentu FRET-FLIM. Do analiz wybierano protoplasty o kulistym kształcie, równomiernie rozmieszczonych chloroplastach oraz o zbliżonym poziomie intensywności sygnałów obu badanych białek fuzyjnych.

Do analiz opisanych w niniejszej pracy wykorzystano skaningowy mikroskop konfokalny Nikon A1Rsi z obiektywem 40x/1,25 z imersją wodną oraz mikroskop konfokalny Leica Stellaris 8 z obiektywem 60x/xxx z imersją olejową. Fluorescencję białka EGFP wzbudzano laserem diodowym o długości fali 488nm, a jej detekcję rejestrowano w zakresie spektralnym 525/50nm. Fluorescencję białka tagRFP wzbudzono laserem diodowym o długości fali 561nm, a jej detekcję zarejestrowano w zakresie spektralnym 595/50nm. Otrzymany obraz analizowano w czasie rzeczywistym za pomocą oprogramowania załączonego do mikroskopu (program NIS-Elements).

Analiza FRET-FLIM

Do analiz FRET-FLIM wykorzystano system Pico-Harp300-Dual Channel SPAC (PicoQuant) połączony z mikroskopem Nikon A1Rsi. Do generowania pulsów światła o długości 100ps i częstotliwości 40 MHz użyto lasera Picosecond Pulsed Diode Laser LDH-D-C-485 (PicoQuant).

Technologia FRET-FLIM wykorzystuje zjawisko nieradiacyjnego przekazania energii przez jedno wzbudzone białko fluorescencyjne (zwane donorem) innemu białku fluorescencyjnemu (zwanemu akceptorem), które w wyniku tego procesu również ulega wzbudzeniu. Przekazanie energii jest możliwe tylko wtedy, gdy odległość pomiędzy donorem i akceptorem jest mniejsza niż 10nm.

W niniejszej pracy analizowano czas trwania fluorescencji donora w obecności akceptora. Gdy dochodzi do interakcji białka donorowego z białkiem akceptorowym (czyli gdy badane białka połączone z donorem i akceptorem bezpośrednio ze sobą oddziałują) to część energii wzbudzenia donora zostaje przekazana białkowi akceptorowemu prowadząc do skrócenia czasu trwania fluorescencji donora. By obliczyć czas trwania fluorescencji białka donorowego, fluorescencję donora wzbudzano przez emisję światła o odpowiednich częstotliwościach. Następnie rejestrowano obraz fluorescencji o rozdzielczości 256 x 256 pikseli przez 90 – 120 sekund ze średnią wartością „count rate” równą $10^4/s$. Do stworzonego w ten sposób obrazu przypisywana była krzywa spadku fluorescencji (ang. *fluorescence decay curve*). Do krzywej następnie dopasowywany był dwuskładnikowy model funkcji, który umożliwiał poprawne wyliczenie czasu trwania fluorescencji. W celu zmniejszenia możliwości uzyskania fałszywie pozytywnych wyników przez wzbudzanie chlorofilu w protoplastach oraz fakt, że badane białka występowały tylko w jądrze, czas trwania fluorescencji był wyliczany tylko dla cząsteczek znajdujących się na terenie jądra komórkowego.

Dla każdej sprawdzanej pary (Donor-Akceptor) do pomiarów używano 10-25 komórek protoplastów pochodzących z minimum 3 powtórzeń biologiczno/technicznych. Za takie powtórzenia uznano protoplasty uzyskane z innych partii roślin i izolowane w sposób niezależny. Uzyskane wyniki z każdej pary posłużyły do obliczenia wartości średniej oraz błędu standardowego średniej (SEM). Wartości te posłużyły do stworzenia wykresów

przedstawionych w pracy. Istotność statystyczna między próbą badaną oraz próbą kontrolną została obliczona z użyciem testu Mann–Whitney–Wilcoxon ($p < 0.001$).

4.6. Transformacja roślin metodą „floral dip”

Wektory pUBN służące transformacji roślin użyto w pierwszej kolejności do transformacji bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, szczep AGL, metodą elektroporacji. Transformowane bakterie hodowano na pożywce stałej LB zawierające antybiotyki rifampicynę, streptomycynę i spektynomycynę w temperaturze 28°C przez 48 godzin. W celu zidentyfikowania kolonii efektywnie transformowanych wektorem przeprowadzono PCR kolonijny z użyciem startera komplementarnego do sekwencji wektora oraz startera komplementarnego do sekwencji kodującej badane białko. Bakterie zawierające pożądane wektory hodowano następnie w 100ml płynnej pożywki LB z dodatkiem antybiotyków rifampicyliny, streptomycyny i spektynomycyny w temperaturze 28°C z wytrząsaniem 160RPM przez 48 godzin. Po upływie tego czasu, 50ml hodowli przelano do probówki typu Falcon o pojemności 50ml i zwirowano w wirówce z chłodzeniem Heraeus Biofuge Stratos (Thermo) (10 minut, temperatura pokojowa, 5000x g). Supernatant usunięto, a osad bakteryjny zawieszono w 50ml 5% (w/v) roztworu sacharozy w wodzie. Do zawiesiny dodano 15µl surfaktantu Silvet Gold (Chemtura). Do transformacji przygotowano od 8 do 16 roślin poprzez usunięcie otwartych kwiatów i uformowanych już łuszczynek. Tak przygotowane rośliny zanurzono kilkakrotnie w przygotowanej zawieszynie bakteryjnej. Po zanurzeniu, rośliny ułożono w pozycji poziomej i pozostawiono na 24h pod przykryciem z folii aluminiowej. Po tym czasie rośliny ustawiono w pozycji pionowej i hodowano do uzyskania nasion.

Następnie, zebrane nasiona transformowanych roślin *A. thaliana* poddano obserwacji w mikroskopie stereoskopowym Stereo Lumar V.12 firmy ZEISS, w celu zidentyfikowania transformantów, wykazujących sygnał fluorescencyjny.

4.7. Analizy bioinformatyczne

Analiza wyników koimmunoprecypitacji białek

Pierwsza część analizy bioinformatycznej została wykonana przez laboratorium przeprowadzające identyfikację białek z użyciem spektrometrii mas (Środowiskowa

Pracownia Spektrometrii Mas, IBB PAN). Laboratorium to zidentyfikowało peptydy z użyciem algorytmu Mascot oraz bazy danych TAIR10.

Lista zawierająca liczbę fragmentów widm spektralnych MS/MS dla każdego ze zidentyfikowanych białek została przygotowana z użyciem programu MScan. Następnie analiza pokazująca wzbogacenie wykrytych białek względem kontroli została wykonana przy użyciu oprogramowania R studio oraz pakietu IPinquiry4 (120). Analiza ta pozwoliła obliczyć dla każdego białka krotność zmian względem kontroli oraz istotność statystyczną oznaczoną wartością P, która następnie była poprawiona korektą Benjamini–Hochberg’a na wielokrotne testowanie hipotezy. Z tego powodu za wyniki istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$ z uwzględnieniem wyżej wymienionej poprawki, które zostały opisane na wykresach jako adjp (ang. adjusted P value).

Analizy wyników wysokoprzepustowego sekwencjonowania sRNA

Najpierw dane zostały poddane deduplikacji z użyciem skryptu perl prinseq_lite.pl z użyciem następujących opcji -phred64 -derep. W następnej kolejności używając programu cutadapt (wersja 3.5) zostały usunięte adaptory, a później pierwsze 4 nukleotydy z końca 5'. Tak przycięte sekwencje zostały przefiltrowane z użyciem programu cutadapt, co pozwoliło na uzyskanie tylko sekwencji o długości od 18 do 42 nt. Pozostawione sekwencje zostały przyrównane do listy dojrzałych cząsteczek miRNA (miRBase) z użyciem skryptu countreads mirna.pl (121). Uzyskana tabela ze zliczeniami przypisanymi do dojrzałych cząsteczek miRNA została wykorzystana do analizy statystycznej z użyciem oprogramowania R studio wraz z pakietem DESeq2 (122). Program 3D RNA-seq został użyty do przeprowadzenia analizy danych splicingowych. Natomiast analiza GO została przeprowadzona z użyciem oprogramowania R studio z wykorzystaniem pakietów "AnnotationDbi", "org.At.tair.db", "biomaRT", "clusterProfiler".

Analizy wyników wysokoprzepustowego sekwencjonowania transkryptomu

Surowe odczyty zostały przycięte o pierwsze 12 nukleotydów używając FASTX-Toolkit (fastx_trimmer z opcją -f 11). Następnie sekwencje adapterów zostały usunięte z użyciem narzędzia Trimmomatic (123). Takie odczyty zostały zmapowane do genomu *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) z użyciem narzędzia HISAT2 z użyciem następujących opcji: --rna-strandness RF. W następnej kolejności z użyciem narzędzia Stringtie i skryptu python prepDE.py uzyskana została tabela zliczeń dla poszczególnych genów. Dla tej analizy

została użyta adnotacja TAIR10.46.gtf wzbogacona o geny pri-miRNA pochodzące z bazy danych mirEX2 (118). Tabela ta została wykorzystana do analizy statystycznej z użyciem oprogramowania R studio wraz z pakietem DESeq2 (122).

Analiza wyników wysokoprzepustowego sekwencjonowania z eksperymentu celowanego DMS-MaPseq

Surowe odczyty zostały przycięte o sekwencje adapterów z użyciem narzędzia cutadapt (wersja 3.5). Przycięte odczyty zostały zmapowane do sekwencji 14 genów (13 genów MIRNA oraz UBQ4). Do mapowania został użyty program bowtie2 z następującymi opcjami: --end-to-end -D 20 -R 5 -N1 -L12 -i S,1,0.5 --no-unal --no-discordant --no-mixed -X 1000. Zmapowane odczyty w postaci plików z rozszerzeniem .bam zostały wczytane i dalej procesowane w oprogramowaniu R studio z użyciem pakietu txttools (124). Program ten obliczył liczbę niesparowań w pozycjach referencyjnych, a uzyskana liczba została użyta jako współczynnik niedopasowania. Następnie wartość ta dla A i C została przeliczona dla każdego pri-miRNA i każdego warunków na wartość reaktywności DMS z użyciem poniższego wzoru:

$$N_{AC} = \max\{\langle r_{AC} \rangle_{[P_{90}, P_{95}]}, P_{75}(r_{AC} > 0.001)\}$$

Uzyskana reaktywność DMS została wykorzystana do przewidzenia struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem oprogramowania RNAstructure (wersja 6.5) (125). Do jego przewidzenia został wykorzystany pakiet fold z opcjami -dms -t . Do opcji -dms został dodany plik z obliczoną reaktywnością DMS, natomiast do opcji -t został dodany parament temperatury. Dla roślin hodowanych w temperaturze 22°C -t wynosiło 295.15, natomiast dla roślin hodowanych w temperaturze 16°C parametr -t wynosił 289.15. Wizualizacja struktury drugorzędowej została wykonana z użyciem oprogramowania VARNA (126).

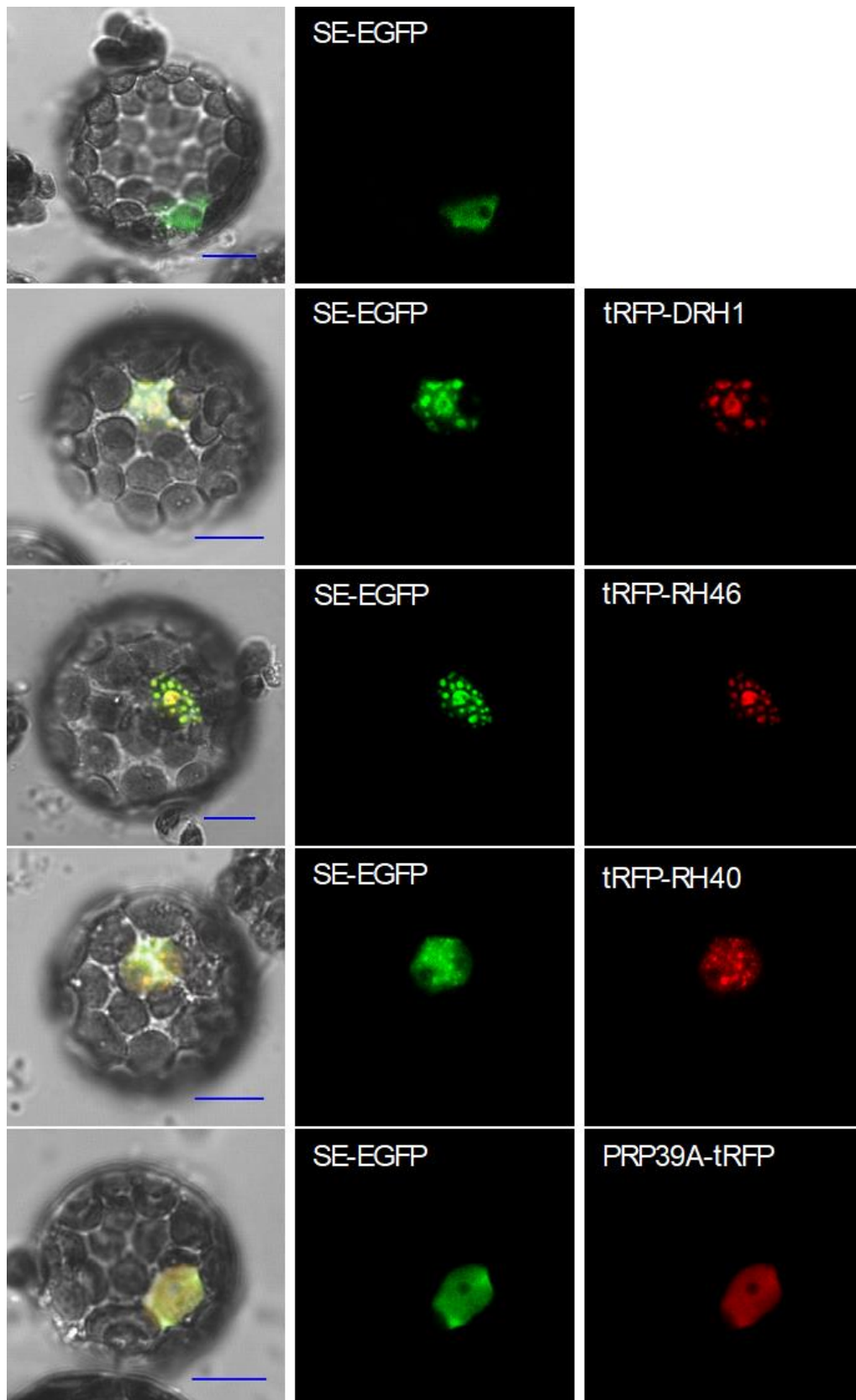
5. Wyniki

5.1. DRH1 bezpośrednio oddziałuje z SERRATE

SERRATE jest wielofunkcyjnym białkiem oddziałującym z wieloma białkami zaangażowanymi w różnorodne procesy związane z RNA (45). W celu lepszego poznania roli białka SE u *Arabidopsis*, w Zakładzie Ekspresji Genów przeprowadzono eksperyment koimmunoprecypitacji, w którym, za pomocą przeciwciał rozpoznających etykietę FLAG, wykonano immunoprecypitację białka fuzyjnego FLAG-SE, a współwytrącone z nim białka zidentyfikowano za pomocą spektrometrii mas (MS). Co ciekawe, głównymi białkami współwytrącającymi się z SE nie były białka związane z biogenezą miRNA, a białka należące do kompleksów THO/TREX (ang. *TR*anscription and *EX*port) oraz NEXT (ang. *Nuclear EX*osome Targeting), zaangażowane odpowiednio w (1) transkrypcję, splicing i dojrzewanie końców RNA oraz (2) degradację RNA. Ponadto, liczną grupą białek współwytrąconych z SE były helikazy z rodziny DEAD-box (45). Spośród nich interesującą podgrupę stanowią blisko spokrewnione ze sobą helikazy DRH1, RH46 oraz RH40, które jako jedyne z całej rodziny DEAD-box u roślin zawierają domenę WW (87,88), o której wiadomo z wcześniejszych badań, że może oddziaływać z domeną CTD polimerazy RNA II (90).

W celu sprawdzenia bezpośredniego oddziaływania pomiędzy SE a DRH1, RH46 oraz RH40 wykorzystano technikę FRET-FLIM (ang. *förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging*). Analiza FRET-FILM umożliwia zmierzenie czasu fluorescencji donora (w tym przypadku donorem jest białko zielonej fluorescencji, EGFP, ang. *enhanced green fluorescent protein*), który obniża się w obecności akceptora (w tym przypadku białko czerwonej fluorescencji, tRFP, ang. *tag red fluorescent protein*) jeśli znajduje się on w odległości mniejszej niż 10 nm. Eksperyment rozpoczęto od wyizolowania protoplastów z liści dwutygodniowych roślin *Arabidopsis thaliana*, które następnie transfekowano wektorami zawierającymi sekwencje kodujące badane białko w fuzji z białkami fluorescencyjnymi (EGFP lub tRFP), w zależności czy dane białko miało być donorem, czy akceptorem. W pierwszej kolejności zbadano lokalizację komórkową badanych białek. Zgodnie z danymi literaturowymi DRH1 oraz RH46 były zlokalizowane w jądrze komórkowym. Dodatkowo, DRH1 i RH46 akumulowały się w jąderku (ryc. 7) (91). Zaobserwowano także jądrową lokalizację helikazy RH40. Białko to nie gromadziło się jednak w jąderku. Następnie, kotransfekowano protoplasty odpowiednią parą plazmidów, z których jeden zawierał sekwencję kodującą SE w fuzji z EGFP, a drugi sekwencję kodującą

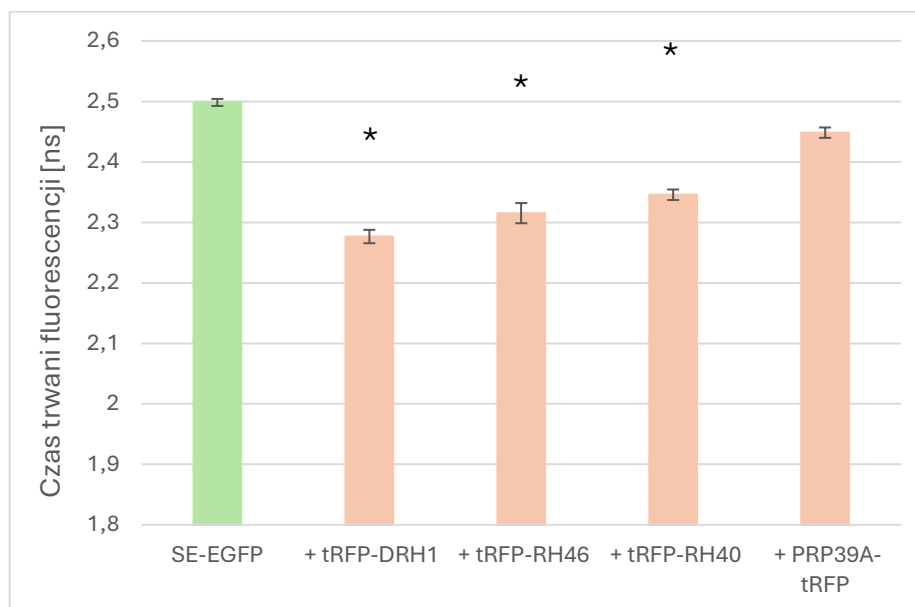
jedną z badanych helikaz lub białko PRP39A, które stanowiło kontrolę negatywną eksperymentu, w fuzji z tRFP. Brak oddziaływania pomiędzy SE i PRP39A został wcześniej zbadany i opisany (95). Wszystkie trzy helikazy wykazywały wysoką kolokalizację z białkiem SE. Ponadto, w przypadku wspólnej ekspresji DRH1 lub RH46 z SE, zaobserwowano akumulację SE w jąderku. W przypadku wspólnej ekspresji SE i PRP39A zaobserwowano jednolitą, rozproszoną lokalizację jądrową, bez wyraźnych miejsc akumulacji obu badanych białek (ryc. 7).



Rycina 7. Kolokalizacja białka fuzyjnego SE-EGFP z helikazami DEAD-box w fuzji z tRFP na końcu aminowym: tRFP-DRH1, tRFP-RH46, tRFP-RH40 oraz PRP39A-tRFP

(kontrola negatywna w eksperymencie FRET-FLIM). Zdjęcia przedstawiają transfekowane protoplasty wyizolowane z liści *Arabidopsis thaliana*. Skala = 10µm.

Następnie przeprowadzono analizę FRET-FLIM. Czas fluorescencji donora, którym było EGFP w fuzji z SE, uległ skróceniu w obecności każdej z badanych helikaz będących w fuzji z akceptorem (tRFP). Sugeruje to występowanie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy SE a DRH1, RH46 i RH40. Istotnego statystycznie skrócenia czasu fluorescencji donora nie zaobserwowano natomiast w obecności PRP39A-tRFP (ryc. 8).



Rycina 8. Analiza oddziaływania między białkiem fuzyjnym *SERRATE-EGFP* a badanymi helikazami *DEAD-box* w fuzji z białkiem *tRFP* przy użyciu techniki *FRET-FLIM* w protoplastach *Arabidopsis thaliana*. Białko fuzyjne *PRP39A-tRFP* służyło jako kontrola negatywna eksperymentu. Czas fluorescencji donora wyrażony jest w nanosekundach. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM, ang. standard error of the mean). Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora, w porównaniu do kontroli negatywnej (*PRP39A-tRFP*) obliczoną za pomocą testu *Mann–Whitney–Wilcoxon* – (*<0.001).

5.2. Charakterystyka mutantów *Arabidopsis thaliana* pozbawionych helikaz DRH1, RH46 i RH40

Prace nad poznaniem funkcji helikaz DRH1, RH46 i RH40 w biogenezie miRNA u *Arabidopsis* rozpoczęto od analizy fenotypów mutantów badanych helikaz. Do badań wykorzystano mutanty insercyjne: SALK_063362 (*drh1-1*), SALK_068359 (*rh46-1*) oraz SALK_056041 (*rh40-1*). Zarówno mutanty pojedyncze (*drh1-1*, *rh46-1*, *rh40*), jak i podwójne uzyskane poprzez krzyżowanie mutantów pojedynczych (*drh1-1 rh46-1*, *drh1-1*

rh40-1, *rh46-1 rh40-1*) nie wykazały żadnych zmian fenotypowych. Następnie przygotowano potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Uzyskany mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* również nie wykazywał zmian fenotypowych podczas hodowli w standardowych warunkach (22°C) (ryc. 9). Jednakże, podczas hodowli roślin w warunkach obniżonej temperatury (16°C), mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wykazał silne zmiany w fenotypie w porównaniu z rośliną typu dzikiego (ryc. 10). Roślina *drh1-1 rh46-1 rh40-1* przejawia upośledzenie wzrostu oraz zmiany w kolorze liści rozety, które są dużo ciemniejsze niż w przypadku rośliny typu dzikiego. Mutanty *drh1-1*, *rh46-1*, *rh40*, *rh1-1 rh46-1*, *drh1-1 rh40-1* oraz *rh46-1 rh40-1* nie przejawiały żadnych zmian w fenotypie w warunkach obniżonej temperatury (16°C).



Rycina 9. Fenotyp trzy- i czterotygodniowych roślin typu dzikiego (wt) i mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w standardowych warunkach hodowli (22°C). Skala = 5mm.



Rycina 10. Fenotyp cztero- i pięcioletniowych rośliny typu dzikiego (wt) i mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, hodowanych w 16°C. Skala = 5mm.

Jak wykazały wyniki sekwencjonowania nowej generacji transkryptomu (RNA-seq), opisane dokładniej w dalszej części niniejszej pracy (podrozdział 5.6.), przygotowany mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* nie wykazuje ekspresji żadnej z trzech badanych helikaz. U rośliny typu dzikiego zaobserwowano obecność transkryptów mRNA *DRH1*, *RH46* i *RH40*. W potrójnym mutancie helikazowym nie odnotowano natomiast obecności transkryptów badanych genów, co świadczy o skuteczności wprowadzonej insercji T-DNA blokującej ekspresję genów *DRH1*, *RH46* i *RH40* (ryc. 11, 12, 13).

A.

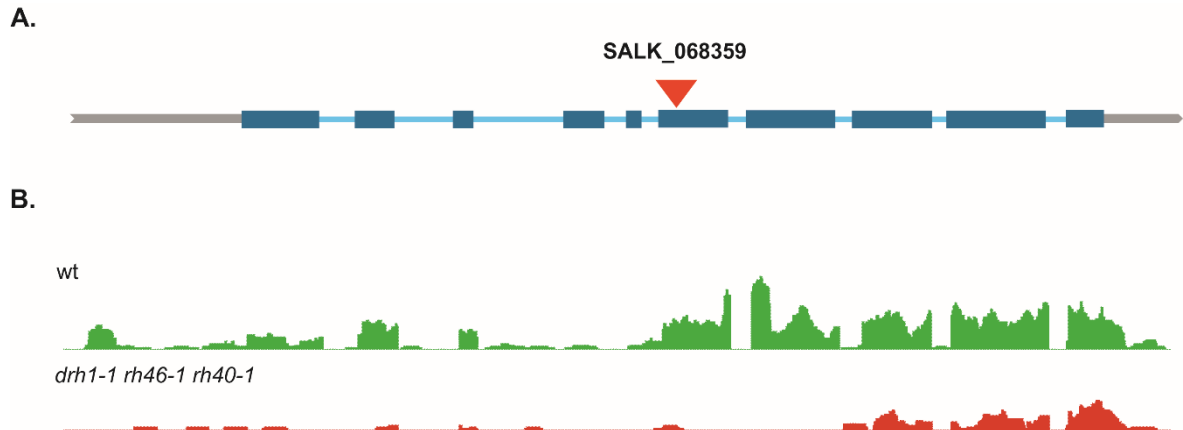


B.

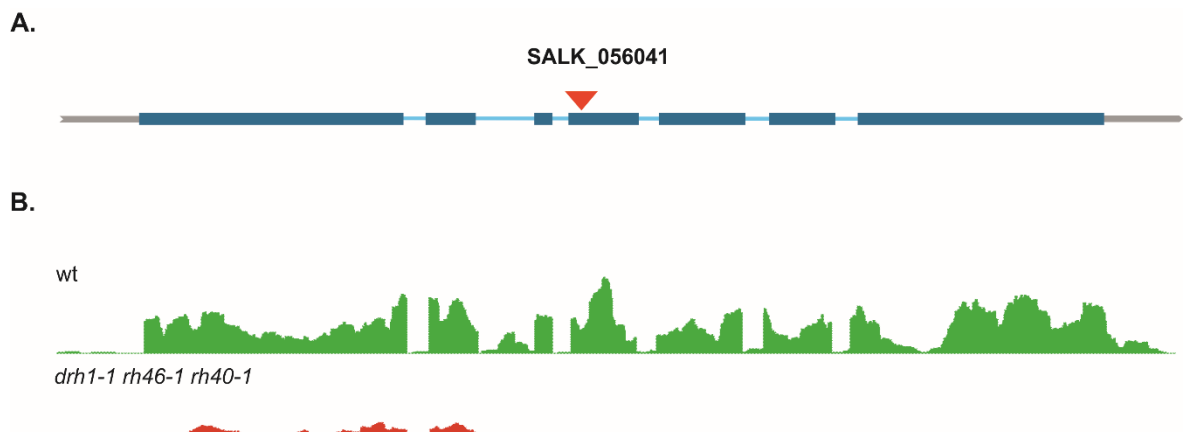


Rycina 11. Miejsce insercji T-DNA w mutancie *SALK_063362*. A. Graficzna prezentacja genu *AT3G01540* kodującego helikazę *DRH1*; fragmenty UTR oznaczono na szaro, introny na jasnoniebiesko, a egzony oznaczono kolorem ciemnoniebieskim, kierunek transkrypcji wyznaczają zakończenia fragmentów UTR; miejsce insercji wskazuje odwrócony, czerwony

trójkąt. B. Wpływ insercji na transkrypcję: brak mapujących odczytów za miejscem insercji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (czerwony profil ekspresji) w przeciwieństwie do rośliny typu dzikiego (zielony profil ekspresji). Profile przygotowane w przeglądarce IGV, z wykorzystaniem normalizowanych odczytów sekwencjonowania RPM rośliny typu dzikiego i potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*.



Rycina 12. Miejsce insercji T-DNA w mutancie SALK_068359. A. Graficzna prezentacja genu *AT5G14610* kodującego helikazę RH46; fragmenty UTR oznaczono na szaro, introny na jasnoniebiesko, a egzony oznaczono kolorem ciemnoniebieskim, kierunek transkrypcji wyznaczają zakończenia fragmentów UTR; miejsce insercji wskazuje odwrócony, czerwony trójkąt. B. Wpływ insercji na transkrypcję: brak mapujących odczytów za miejscem insercji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (czerwony profil ekspresji) w przeciwieństwie do rośliny typu dzikiego (zielony profil ekspresji). Profile przygotowane w przeglądarce IGV, z wykorzystaniem normalizowanych odczytów sekwencjonowania RPM rośliny typu dzikiego i potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*.



Rycina 13. Miejsce insercji T-DNA w mutancie SALK_056041. A. Graficzna prezentacja genu *AT3G06480* kodującego helikazę RH40; fragmenty UTR oznaczono na szaro, introny na jasnoniebiesko, a egzony oznaczono kolorem ciemnoniebieskim, kierunek transkrypcji wyznaczają zakończenia fragmentów UTR; miejsce insercji wskazuje odwrócony, czerwony trójkąt. B. Wpływ insercji na transkrypcję: brak mapujących odczytów za miejscem insercji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (czerwony profil ekspresji) w przeciwieństwie do rośliny typu dzikiego (zielony profil ekspresji). Profile przygotowane w przeglądarce IGV, z

wykorzystaniem normalizowanych odczytów sekwencjonowania RPM rośliny typu dzikiego i potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*.

5.3. Charakterystyka linii transgenicznej ekspresyjnej helikazę DRH1 w tle potrójnego mutantu helikazowego

W celu zbadania roli badanych helikaz postanowiono przygotować linię transgeniczną ekspresyjną jedną z nich w tle potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Zdecydowano o wprowadzeniu sekwencji kodującej helikazę DRH1, gdyż białko to w roślinie typu dzikiego ulega ekspresji na najwyższym poziomie spośród wszystkich trzech badanych helikaz. Dodatkowo, DRH1 jest jedyną helikazą *A. thaliana*, której aktywność helikazowa została potwierdzona eksperymentalnie (92). Przygotowano zatem transgen składający się z sekwencji kodującej (CDS) DRH1 w fuzji z białkiem GFP pod kontrolą promotora ubikwityny 10 *A. thaliana*. Zdecydowano się na wykorzystanie mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* by zbadać funkcje wspólne badanych helikaz i scharakteryzować fenotyp mutantu w 16°C w obecności tylko jednej z trzech badanych helikaz. Do przygotowania tych linii wykorzystano technikę FAST (ang. *fluorescence-accumulating seed technology*), która pozwala na szybką identyfikację transformowanych nasion. Identyfikacja ta jest możliwa dzięki wykorzystaniu markera selekcyjnego składającego się z sekwencji kodującej oleozynę OLE1 w fuzji z tRFP pod kontrolą promotora OLE1. Obecność promotora OLE1 pozwala na ekspresję transgenu OLE1-tRFP tylko w oleosomach, które są strukturami występującymi w nasionach. Dzięki temu możliwa jest szybka selekcja skutecznie transformowanych nasion przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Do wektora zawierającego konstrukt OLE1-tRFP wprowadzono sekwencję kodującą helikazę DRH1. Przygotowany wektor użyto do transformacji roślin *Arabidopsis* za pomocą bakterii *Agrobacterium tumefaciens* i metody *floral dip*. Transformowane rośliny hodowano do momentu wykształcenia dojrzałych łuszczyń nasiennych. Po zasuszeniu nasion zebrano je i obejrzano w poszukiwaniu nasion wykazujących sygnał fluorescencyjny. W nasionach pomyślnie transformowanych wektorem spodziewano się zaobserwować sygnał czerwonej fluorescencji (ryc. 14).

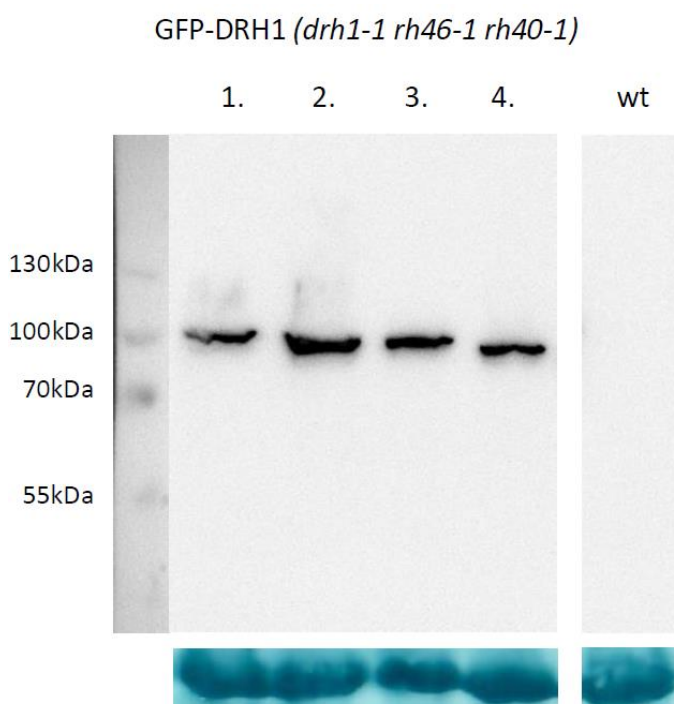


Rycina 14. Zdjęcie mikroskopowe nasion pokolenia T0 wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Strzałkami zaznaczono nasiona pomyślnie stransformowane wektorem, wykazujące ekspresję tRFP-OLE1 z widocznym sygnałem fluorescencyjnym.

Na dalszym etapie przygotowania linii transgenicznych skoncentrowano się na znalezieniu linii, w których nasiona pokolenia T1 wykazywały fluorescencję w stosunku 1:2:1 (odpowiednio nasiona bez sygnału : nasiona ze średnim sygnałem : nasiona z silnym sygnałem fluorescencyjnym). Taki rozkład świadczy o obecności tylko jednej insercji wprowadzanego transgeny. Spośród nasion o rozkładzie 1:2:1 wybrano nasiona o najsilniejszym sygnale fluorescencyjnym. (ryc. 15). Takie nasiona wysiano, a następnie rośliny hodowano do czasu wytworzenia dojrzałych łuszczynek nasiennych. Nasiona zebrano i obejrzano pod mikroskopem fluorescencyjnym. W tym pokoleniu poszukiwano równego sygnału fluorescencyjnego u wszystkich nasion zebranych z jednej rośliny. Poziom GFP-DRH1 w wyselekcjonowanych liniach transgenicznych sprawdzono za pomocą techniki Western blot (ryc. 16). Wszystkie linie przejawiały podobny poziom ekspresji białka fuzyjnego GFP-DRH1.



Rycina 15. Analiza nasion pokolenia T1 wykonana za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Widoczne są nasiona z intensywnym i średnim sygnałem fluorescencji oraz nasiona bez sygnału.



Rycina 16. Analiza poziomu GFP-DRH1 za pomocą Western blot w wyselekcjonowanych liniach transgenicznych. Wszystkie linie wykazują podobny poziom ekspresji GFP-DRH1. Materiał z rośliny typu dzikiego białka fuzyjnego został użyty jako kontrola specyficzności użytych przeciwciał. Obraz membrany po wybarwieniu odczynnikiem Amido black przedstawia wyraźnie widoczne prążki Rubisco na wysokości poniżej 55 kDa. Rubisco został wykorzystany jako kontrola nałożenia ekstraktu.

Mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wykazuje silne zmiany fenotypowe w porównaniu do rośliny typu dzikiego podczas hodowli w warunkach obniżonej temperatury (16°C). Analizy

fenotypowe linii transgenicznej, które ekspresji ulega transgen kodujący helikazę DRH1 w fuzji z białkiem GFP, wykazały, że wprowadzony konstrukt GFP-DRH1 jest wystarczający do przywrócenia fenotypu typu dzikiego u potrójnego mutantu helikazowego (ryc. 17.). Wynik ten pokazuje, że helikaza DRH1 jest wystarczająca do przywrócenia prawidłowego funkcjonowania rośliny *A. thaliana*. Ponadto, wynik ten wskazuje, że DRH1 jest zdolne do zastępowania pozostałych brakujących helikaz (RH46 i RH40) i wypełniania ich funkcji. Jest to również potwierdzenie faktu, że fenotyp mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* jest spowodowany brakiem trzech badanych helikaz.

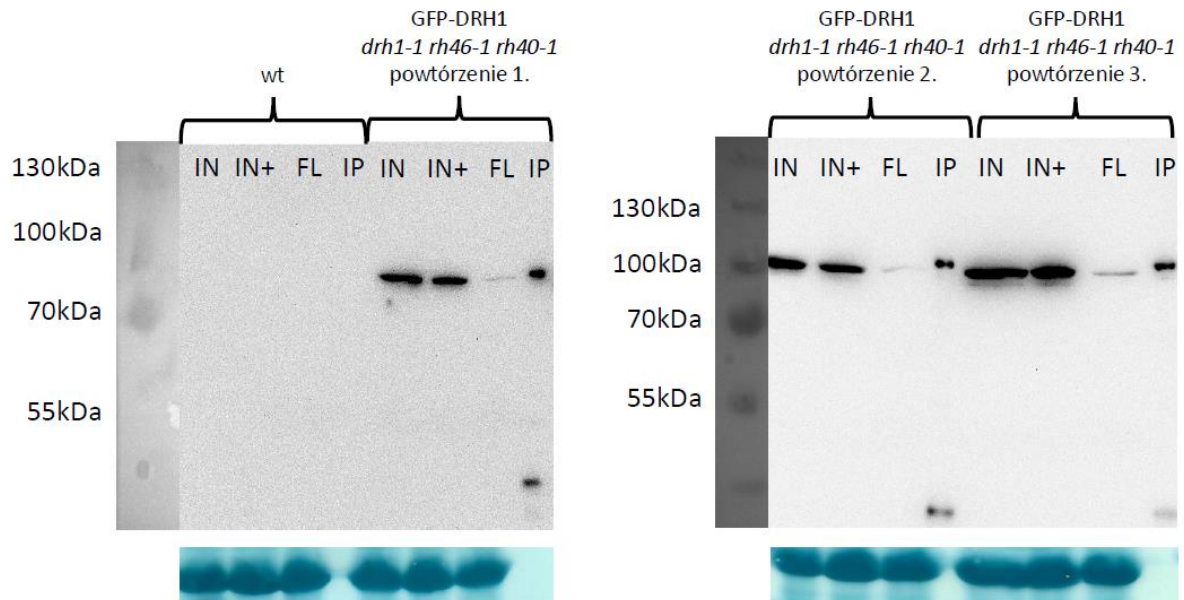


Rycina 17. Fenotyp rośliny typu dzikiego (*wt*), mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* oraz rośliny transgenicznej ekspresyjnej białko fuzyjne GFP-DRH1 w tle mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Skala = 5mm.

5.4. Białka oddziałujące z DRH1

Przygotowaną linię transgeniczną, w której ekspresji ulega białko fuzyjne GFP-DRH1 w tle mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wykorzystano do zbadania interaktomu helikazy DRH1 za pomocą koimmunoprecypitacji połączonej z analizą spektrometrii mas. W pierwszym etapie za pomocą przeciwciał anti-GFP wytracono helikazę DRH1 z ekstraktu białkowego wraz ze wszystkimi zasocjowanymi z nią białkami. Następnie, wydajność immunoprecypitacji sprawdzono poprzez nałożenie 10% objętości każdej z prób na żel poliakrylamidowy (SDS-PAGE). Na żel poliakrylamidowy nałożono także wyjściowy ekstrakt białkowy (IN) w celu sprawdzenia obecności białka fuzyjnego GFP-DRH1 w uzyskanym ekstrakcie, a także frakcję niezwiązaną z przeciwciałem uzyskaną po przejściu ekstraktu białkowego przez kolumnę (FL) wychytującą kulki magnetyczne połączone z przeciwciałem anti-GFP w celu sprawdzenia wydajności wiązania białka przez przeciwciała związane z kulkami magnetycznymi. Dodatkowo nałożono również ekstrakt białkowy pozostawiony na lodzie przez cały czas trwania procedury w celu zbadania stopnia degradacji białka fuzyjnego GFP-DRH1. Po przeprowadzeniu analizy Western blot, zaobserwowano intensywny sygnał w

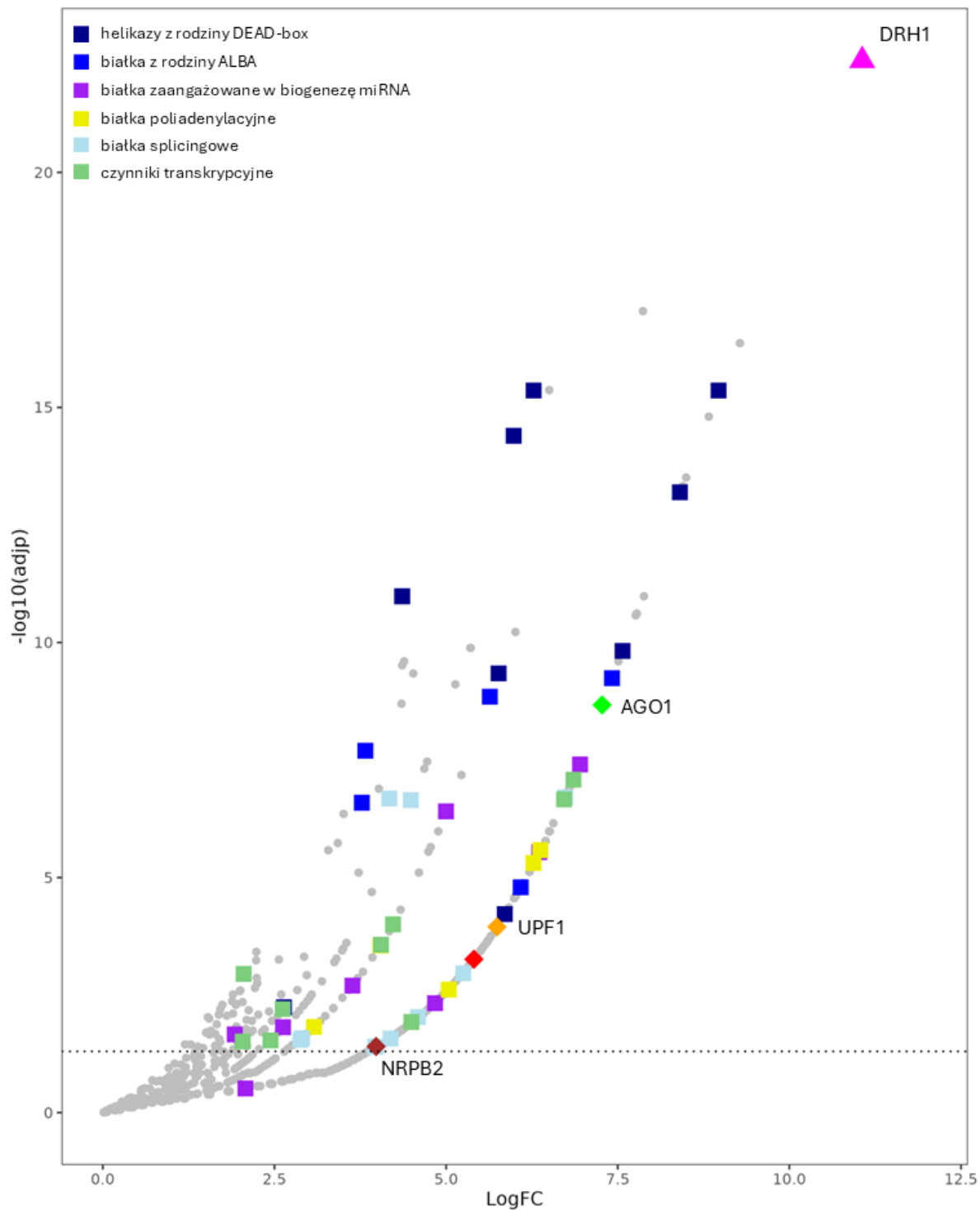
ścieżkach, w których nałożone zostały próby po immunoprecypitacji GFP-DRH1 z ekstraktu otrzymanego z roślin eksprymujących białko fuzyjne GFP-DRH1. Sygnału nie zaobserwowano natomiast w próbach kontrolnych (wt). Wynik ten pokazuje, że immunoprecypitacja przebiegła wydajnie i wyizolowano duże ilości białka DRH1 (ryc. 18).



Rycina 18. Sprawdzenie wydajności przeprowadzonej immunoprecypitacji białka fuzyjnego GFP-DRH1. Detekcja białek z użyciem metody Western blot w celu sprawdzenia ilości białka fuzyjnego GFP-DRH1 uzyskanego po immunoprecypitacji z użyciem przeciwciał antyGFP w roślinach z ekspresją białka fuzyjnego GFP-DRH1, oraz roślinie typu dzikiego (wt), służących w tym eksperymencie jako kontrola. IP (antyGFP) to 10% próby po przeprowadzonej immunoprecypitacji. IN – kontrola nałożona od razu po pobraniu, nałożono na żel 1% ekstraktu użytego do immunoprecypitacji; IN+ – kontrola nałożona przechowywana na lodzie przez cały czas trwania procedury służąca ocenie stopnia degradacji białka, nałożono na żel 1% ekstraktu użytego do immunoprecypitacji; FL – frakcja niezwiązana z przeciwciałem, nałożono na żel 1% ekstraktu użytego do immunoprecypitacji. Obraz membrany po wybarwieniu odczynnikami Amido black przedstawia wyraźnie widoczne prążki Rubisco na wysokości poniżej 55 kDa. Rubisco został wykorzystany jako kontrola nałożenia ekstraktu.

Następnie, pozostałe części każdej z prób badanych i kontrolnych wysłano do Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas IBB PAN w celu przeprowadzenia przez nich analizy proteomicznej z użyciem spektrometrii mas, aby zidentyfikować białka znajdujące się w próbkach. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych i do analiz wysłano trzy próby pochodzące z roślin typu dzikiego i trzy pochodzące z linii transgenicznej eksprymującej GFP-DRH1 w tle mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. W ten sposób zidentyfikowano białka zasocjowane z DRH1. Przeprowadzona analiza

bioinformatyczna wyników spektrometrii mas pozwoliła określić wzbogacenie oraz istotność statystyczną zidentyfikowanych białek w próbie badanej (GFP-DRH1) w porównaniu do próby kontrolnej. Wyniki tego eksperymentu zostały przedstawione w formie wykresu rozrzutu na rycinie 19. zawierającego wszystkie białka wzbogacone w próbie badanej w sposób statystycznie istotny. Za białka współwytrącające się z DRH1 w sposób statystycznie istotny uznano wszystkie białka z wartością P (uwzględniającą poprawkę Benjamini-Hochberg) poniżej 0,05.



Rycina 19. Białka oddziałujące z białkiem fuzyjnym GFP-DRH1 przedstawione na wykresie rozrzutu. Na osi X zaznaczono logarytm o podstawie 2 opisujący krotność zmian względem próby kontrolnej. Na osi Y zaznaczono ujemny logarytm dziesiętny z wartości p , uwzględniając korektę Benjamini–Hochberg (adjp). Linia przerywaną zaznaczono granicę istotności statystycznej ($adjp = 0.05$).

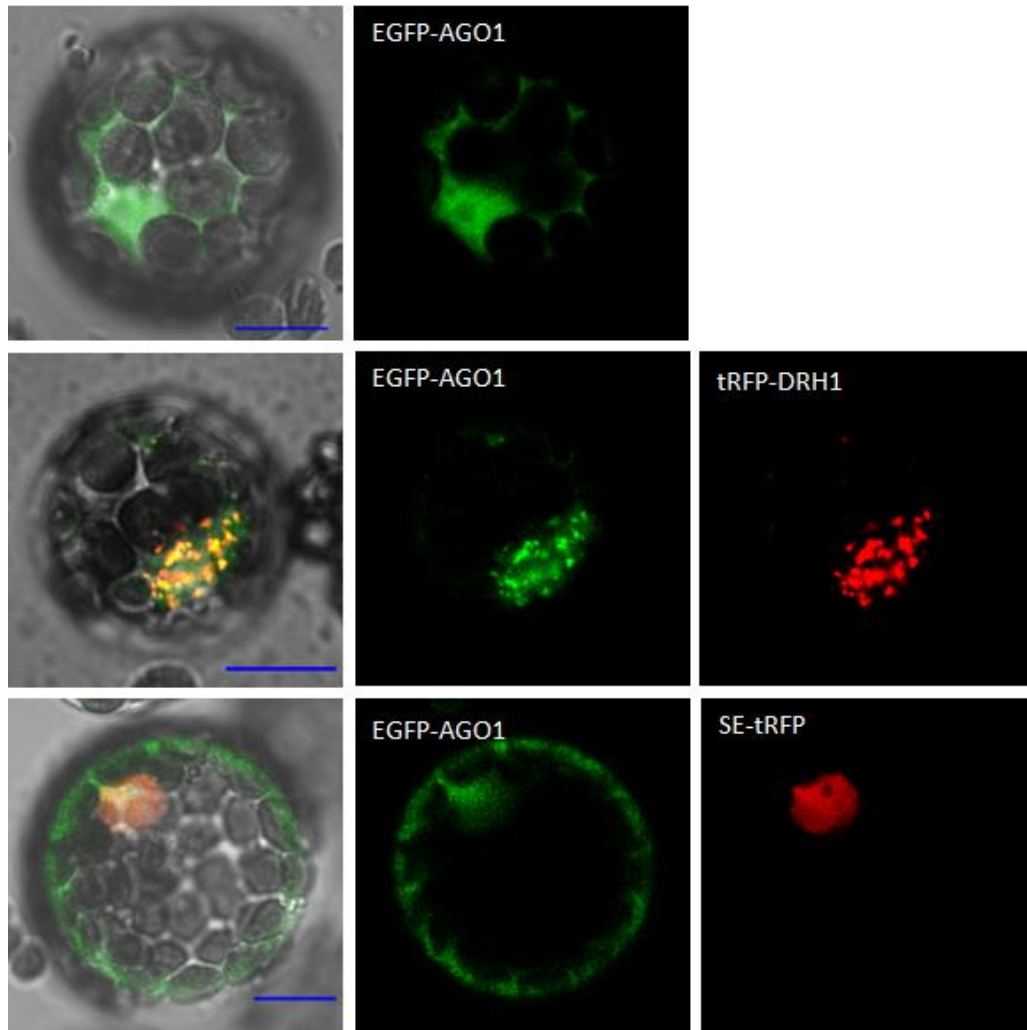
Wśród zidentyfikowanych białek współwytrącających się z DRH1 znalazło się białko UPF1, które zostało opisane jako partner białkowy DRH1 (94). Ponadto, zidentyfikowano białko SE, co potwierdza występowanie scharakteryzowanego w niniejszej pracy oddziaływania między DRH1 i SE. Dodatkowo, oprócz białka SE, zidentyfikowano pięć innych czynników zaangażowanych w biogenezę miRNA zasocjowanych z DRH1: HESO1, CDC5, GRP7, CPL1, a także AGO1, które stanowiło jedno z najbardziej wzbogaconych białek w analizie. Każde z tych białek bierze udział w biogenezie miRNA na różnych etapach: CPL1 (C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1) wpływa na transkrypcję i przetwarzanie pri-miRNA poprzez defosforylację domeny CTD RNAPII (97) oraz HYL1 prowadząc do aktywacji tego białka (98); CDC5 (CELL DIVISION CYCLE 5) wiąże rejony promotorowe genów kodujących miRNA i stymuluje zarówno transkrypcję, jak i przetwarzanie pri-miRNA (99); GRP7 (GLYCINE RICH PROTEIN 7) wpływa na splicing pre-miRNA (100), a HESO1 (HEN1 SUPPRESSOR 1) stanowi pierwszą opisaną UTP-transferazę dodającą nukleotydy urydylowe do 3' końców miRNA, co prowadzi do ich degradacji (101,102). AGO1 natomiast jest głównym białkiem kompleksu RISC odpowiedzialnego za regulację ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym (103).

Wśród białek współwytrąconych z DRH1 znaleziono także białka uczestniczące w splicingu (m.in. BRR2, EMB33, U1-70K), poliadenylacji (CFI25A, FIPS5, CFI68, CPSF30) czy translacji (m.in. eIF4G, eIF3A-1, eIF4A1, eIF3B-2). Asocjacja DRH1 z białkami zaangażowanymi w translację jest niezwykle interesująca, kiedy zwróci się uwagę na lokalizację komórkową tych białek: DRH1 lokalizuje w jądrze komórkowym, podczas gdy białka translacyjne występują w cytoplazmie. Ponadto, ciekawą grupę białek zasocjowanych z DRH1 stanowią także białka będące częścią kompleksu NEXT, RBM7 posiadające domenę wiążącą RNA i ZCCHC8A, które posiada domenę palca cynkowego. Oba te białka oddziałują z SE i są zaangażowane w degradację RNA u *Arabidopsis* (51). Zidentyfikowano także inne białko zaangażowane w degradację RNA: XRN3, które jest egz nukleazą degradującą RNA od końca 5'. Dodatkowo, pomimo występowania bezpośredniego oddziaływania pomiędzy DRH1 a domeną CTD RNAPII, wśród białek współwytrąconych z DRH1 nie znaleziono białka NRPB1. Co ciekawe, zidentyfikowano natomiast drugą z podjednostek RNAPII, białko NRPB2. Analizy wykazały także, że DRH1 jest zasocjowane z wieloma helikazami typu DEAD-box: RH3, RH7, RH8, RH9, RH11, RH23, RH25, RH26, RH30, RH31, RH37, RH52 i RH53.

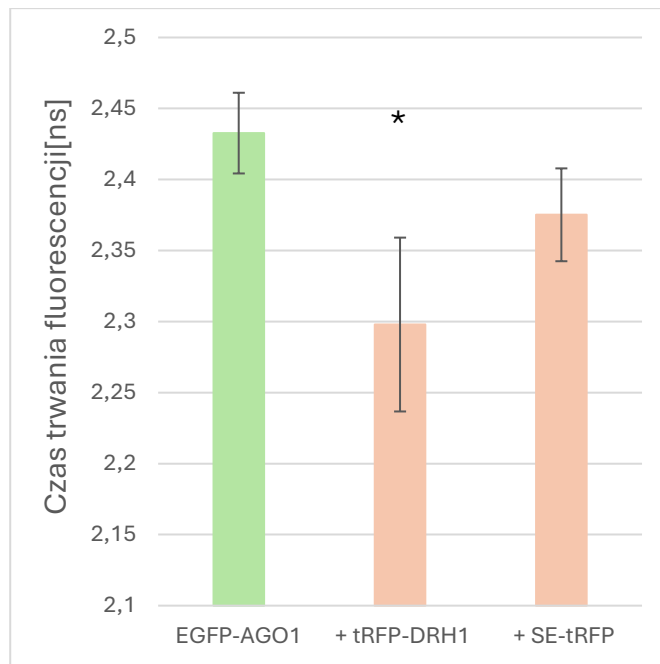
W wyniku koimmunoprecypitacji kompleksów związanych z białkiem DRH1 zidentyfikowano również wiele słabo poznanych u *Arabidopsis* białek. Wśród nich ciekawą

grupę stanowią białka opisane jako „Alba DNA/RNA binding protein”. Genom *Arabidopsis* zawiera geny kodujące sześć białek należących do tej rodziny. Badania pokazały, że DRH1 jest zasocjowane z każdym z nich. Spośród tych białek, ALBA1 i ALBA2 zostały opisane jako białka, które wiążą R-loops, czyli trójniciowe struktury kwasów nukleinowych złożone z hybrydy DNA:RNA i powiązanego z nią jednoniciowego DNA, oraz zapewniają stabilność genomu (104).

Wyniki immunoprecypitacji wykazały, że AGO1 jest białkiem ściśle powiązanym z DRH1. Oprócz roli w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów, AGO1 jest zaangażowane w transport miRNA z jądra do cytoplazmy. Aktywność AGO1 nie ogranicza się jednak tylko do cytoplazmy. Nasze poprzednie badania pokazały, że AGO1 jest także aktywne w jądrze komórkowym, gdzie wiąże się z chromatyną i negatywnie reguluje ekspresję niektórych MIR (105). Oddziaływanie pomiędzy DRH1 a AGO1 zbadano za pomocą mikroskopii konfokalnej i techniki FRET-FLIM. Wyizolowane protoplasty *Arabidopsis* transfekowano plazmidami zawierającymi sekwencje kodujące AGO1 w fuzji z EGFP oraz DRH1 w fuzji z tRFP. Zgodnie z opublikowanymi danymi, AGO1 lokalizowało się w cytoplazmie i jądrze komórkowym. DRH1 i AGO1 wykazywały wysoką kolokalizację w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis* (ryc. 20). Analizy FRET-FLIM wykazały obniżenie czasu trwania fluorescencji donora (GFP-AGO1) w obecności tRFP-DRH1, sugerując bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy DRH1 a AGO1. Obniżenia czasu trwania fluorescencji EGFP-AGO1 nie zaobserwowano w obecności tRFP-SE, który stanowił kontrolę negatywną tego eksperymentów (ryc. 21). Brak oddziaływania pomiędzy AGO1 a SE został wcześniej zbadany i opisany (33).



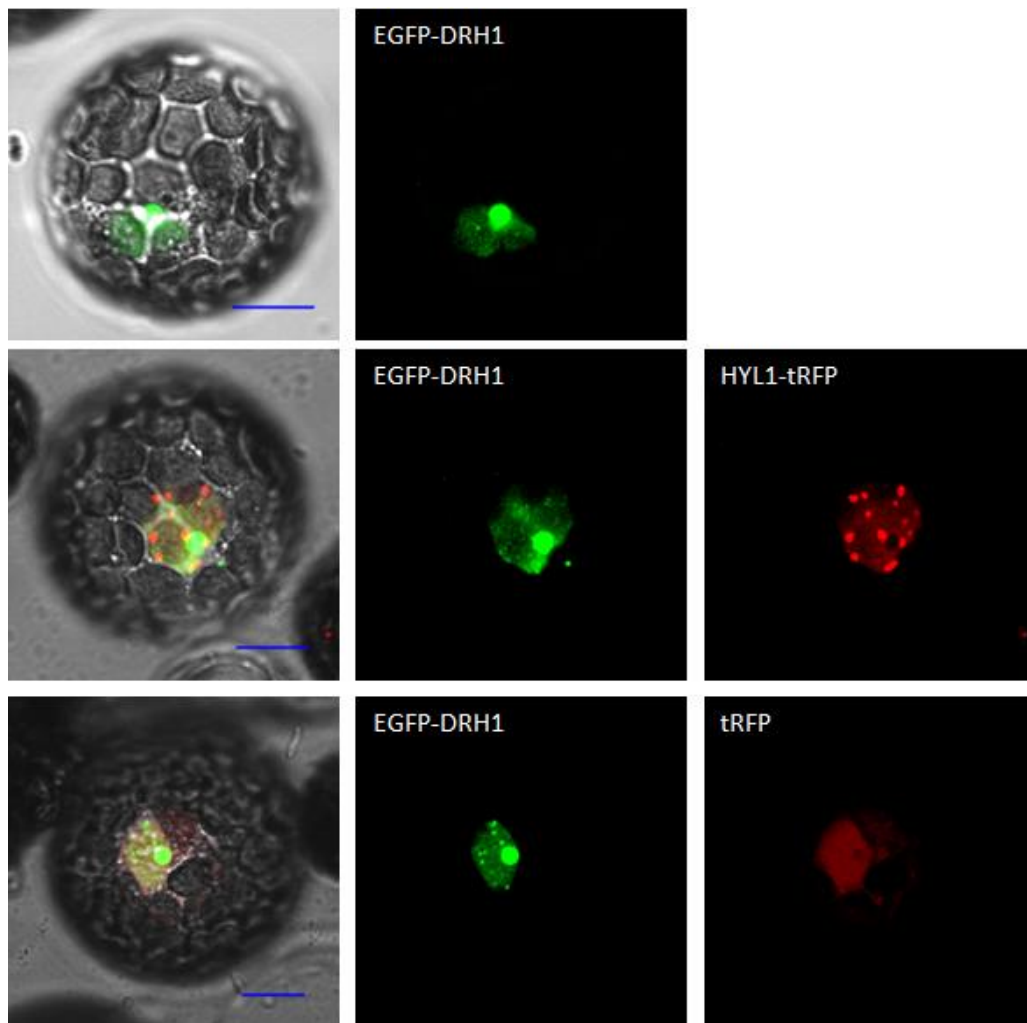
Rycina 20. Kolokalizacja białka fuzyjnego EGFP-AGO1 z tRFP-DRH1 oraz SE-tRFP (kontrola negatywna w eksperymencie FRET-FLIM). Zdjęcia przedstawiają transfekowane protoplasty *Arabidopsis thaliana*. Skala = 10 μ m.



Rycina 21. Analiza oddziaływania między białkiem fuzyjnym EGFP-AGO1 a helikazą DRH1 w fuzji z białkiem tRFP przy użyciu techniki FRET-FLIM w protoplastach *Arabidopsis thaliana*. Białko SE-tRFP służyło jako kontrola negatywna eksperymentu. Czas fluorescencji donora wyrażony jest w nanosekundach. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM, ang. standard error of the mean). Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora w porównaniu do kontroli negatywnej (SE-tRFP) obliczoną za pomocą testu Mann–Whitney–Wilcoxon – ($* < 0.001$).

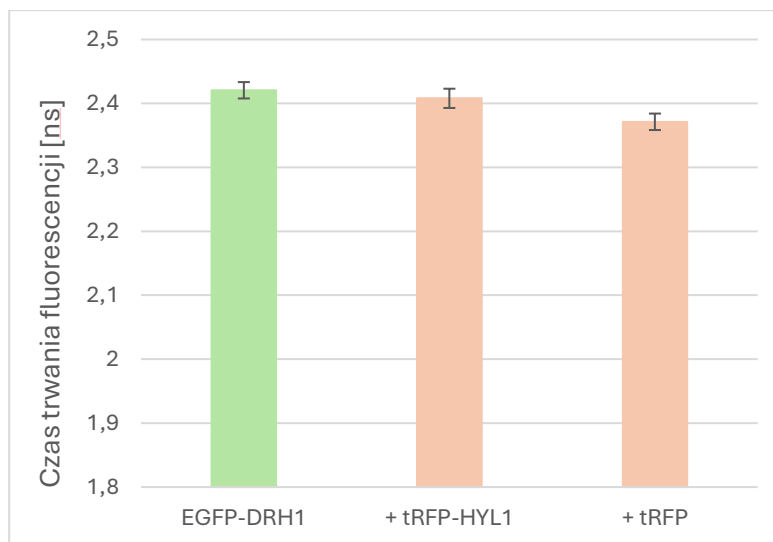
Jak opisano we wcześniejszej części pracy, wśród białek współwytraconych z białkiem fuzyjnym GFP-DRH1 zidentyfikowano kilka białek zaangażowanych w biogenezę miRNA. Nie zidentyfikowano natomiast białka HYL1, które podobnie jak SE, wchodzi w skład rdzenia Mikroprocesora i wspiera aktywność DCL1 (27). Z uwagi na zdolność HYL1 do wiązania dwuniciowych RNA, w dalszej części niniejszej pracy postanowiono zbadać zatem czy DRH1 oddziałuje z HYL1. W celu zbadania oddziaływania DRH1-HYL1 ponownie posłużono się mikroskopią konfokalną i techniką FRET-FLIM. Pracę rozpoczęto od analizy lokalizacji obu białek w komórce. Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi białko HYL1 zlokalizowane jest w jądrze komórkowym (96). Ponadto, widoczne były skupiska HYL1-tRFP na terenie jądra komórkowego, stanowiące prawdopodobnie ciała D (33). W protoplastach transfekowanych wektorami zawierającymi sekwencję kodującą białka fuzyjne EGFP-DRH1 oraz HYL1-tRFP nie zaobserwowano kolokalizacji obu tych białek

(ryc. 22), co może wskazywać na brak występowania bezpośredniego oddziaływania pomiędzy DRH1 i HYL1.



Rycina 22. Kolokalizacja białka fuzyjnego EGFP-DRH1 z HYL1-tRFP oraz tRFP (kontrola negatywna w eksperymencie FRET-FLIM). Zdjęcia przedstawiają protoplasty *Arabidopsis thaliana* transfekowane odpowiednimi wektorami. Skala = 10 μ m.

Hipotezę tę zweryfikowano za pomocą techniki FRET-FLIM. Czas trwania fluorescencji donora, którym był EGFP w fuzji z DRH1, nie uległ istotnej statystycznie zmianie w obecności białka fuzyjnego HYL1-tRFP, co potwierdziło wcześniejsze przypuszczenie o braku oddziaływania pomiędzy tymi białkami. Istotnego statystycznie skrócenia czasu trwania fluorescencji donora nie zaobserwowałam także w obecności tRFP, który stanowił kontrolę negatywną eksperymentu (ryc. 23).



Rycina 23. Analiza oddziaływania między białkiem fuzyjnym EGFP-DRH1 a HYL1 w fuzji z białkiem tRFP, przy użyciu techniki FRET-FLIM, w protoplastach *Arabidopsis thaliana*. Białko tRFP służyło jako kontrola negatywna eksperymentu. Czas fluorescencji donora wyrażony jest w nanosekundach. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM, ang. standard error of the mean).

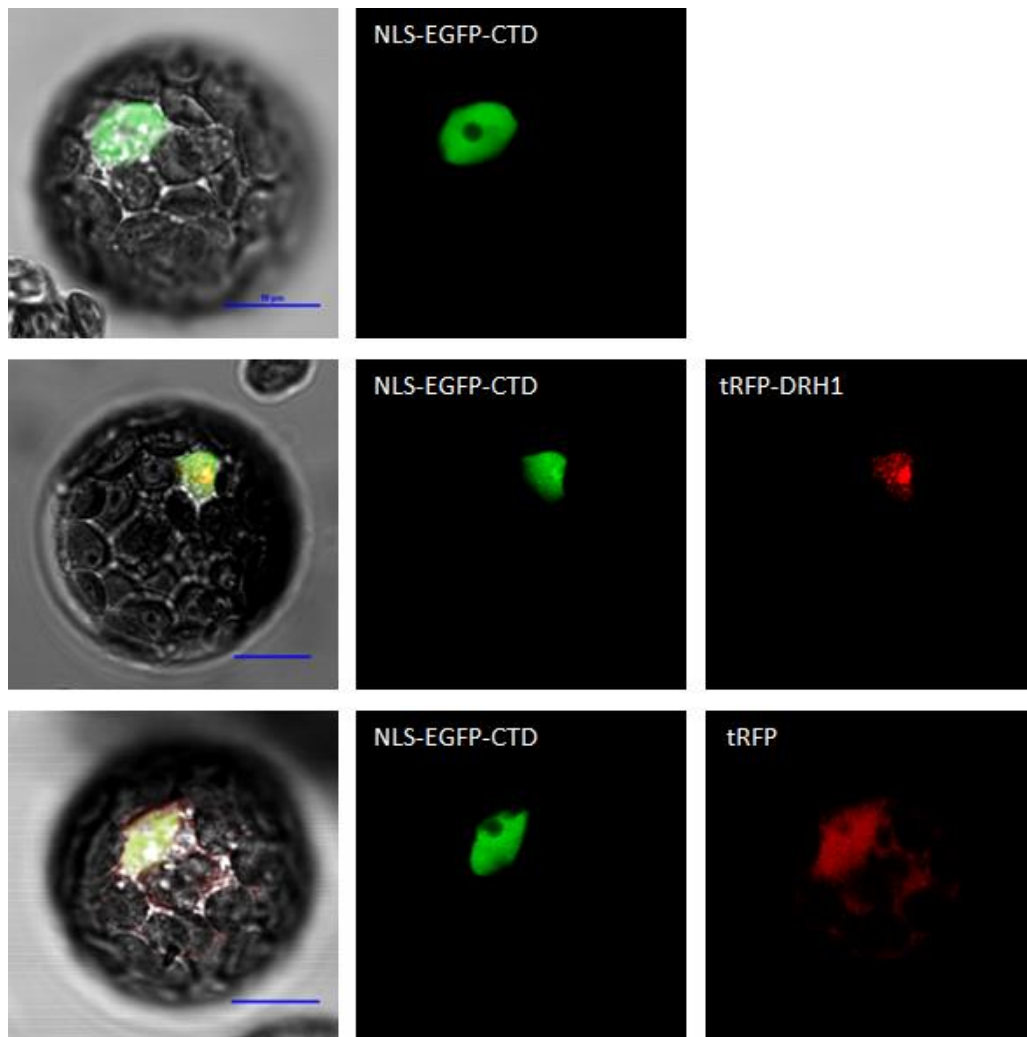
Uzyskane wyniki pokazują, że helikaza DRH1 ma wielu partnerów białkowych zaangażowanych w różnorodne procesy i zdaje się tworzyć wiele różniących się funkcją kompleksów. Wśród białek współwytrąconych z DRH1 zidentyfikowano białka zaangażowane w biogenezę miRNA, transkrypcję, splicing oraz degradację. Wykryto również białka o niepoznanej jak dotąd funkcji.

5.5. Analiza oddziaływania DRH1 z domeną CTD RNA polimerazy II

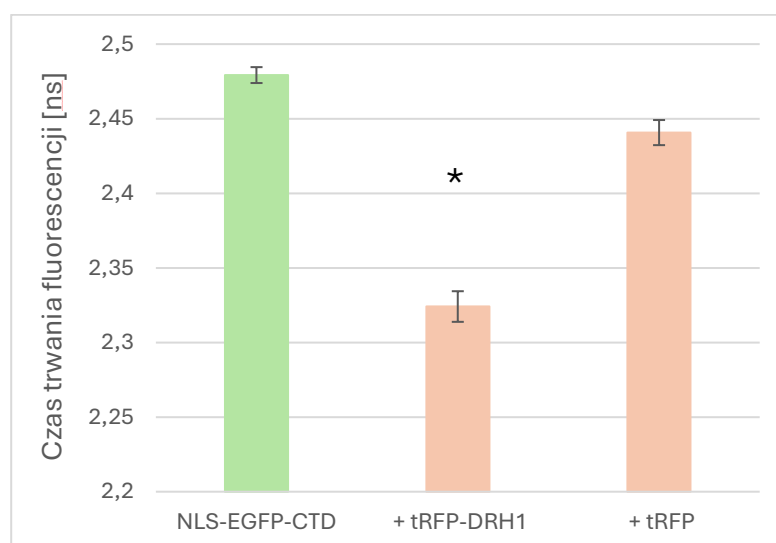
Używając narzędzi bioinformatycznych, DRH1, RH46 i RH40 zostały przewidziane jako partnerzy białkowi RNAPII. Wskazano, że istotną częścią badanych helikaz odpowiedzialną za oddziaływanie RNAPII z badanymi helikazami typu DEAD-box stanowią ich domeny WW, które mają oddziaływać z domeną CTD RNAPII (90). Domena CTD stanowi część białka NRPB1, które jest największą podjednostką RNAPII. Pomimo tych doniesień, wyniki eksperymentu immunoprecypitacji połączonej ze spektrometrią mas (MS) nie wykazały wzbogacenia białka NRPB1 w próbce pochodzącej z linii transgenicznej GFP-DRH1 w tle potrójnego mutantu helikazowego. Wśród białek współwytrąconych w sposób statystycznie istotny z GFP-DRH1 zidentyfikowano natomiast białko NRPB2, które również stanowi podjednostkę RNAPII. W niniejszej pracy postanowiono zatem zbadać oddziaływanie DRH1 z domeną CTD RNAPII. W tym celu przygotowano konstrukt zawierający sekwencję kodującą aminokwasy 1544-1813 NRPB1, składające się na domenę CTD, oraz sekwencję kodującą białko fluorescencyjne EGFP. Dodatkowo, konstrukt zawierał także sygnał

lokalizacji jądrowej (NLS) zapewniający obecność białka fuzyjnego EGFP-domena CTD (EGFP-CTD) w jądrze komórkowym. Do analiz użyto także wektora zawierającego sekwencję kodującą białko fuzyjne RFP-DRH1.

Pracę rozpoczęto od sprawdzenia lokalizacji białka fuzyjnego EGFP-CTD w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis*. Zgodnie z przewidywaniami domena CTD akumulowała się w jądrze komórkowym (ryc. 24). Następnie, protoplasty *Arabidopsis* kotransfekowano plazmidami kodującymi EGFP-CTD oraz tRFP-DRH1. Zaobserwowano wysoką kolokalizację obu białek w jądrze komórkowym, a także ich akumulację w jąderku (ryc. 24). Obecność domeny CTD w jąderku może być wynikiem oddziaływania z białkiem DRH1, które sprowadziło domenę CTD do tej struktury jądrowej. Ponadto, analizy FRET-FLIM wykazały istotne statystyczne obniżenie czasu trwania fluorescencji donora przy obecności tRFP-DRH1 (ryc. 25). Wyniki te wykazują występowanie oddziaływania pomiędzy DRH1, a domeną CTD RNAPII. Czas trwania fluorescencji nie uległ istotnej statystycznie zmianie w obecności tRFP, który stanowił kontrolę negatywną eksperymentu (ryc. 25).

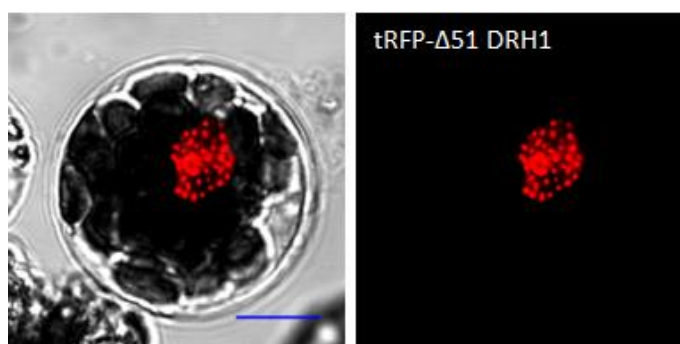


Rycina 24. Kolokalizacja białka fuzyjnego NLS-EGFP-DRH1 z tRFP-DRH1 oraz tRFP (kontrola negatywna w eksperymencie FRET-FLIM). Zdjęcia przedstawiają transfekowane protoplasty *Arabidopsis thaliana*. Skala = 10 μm.



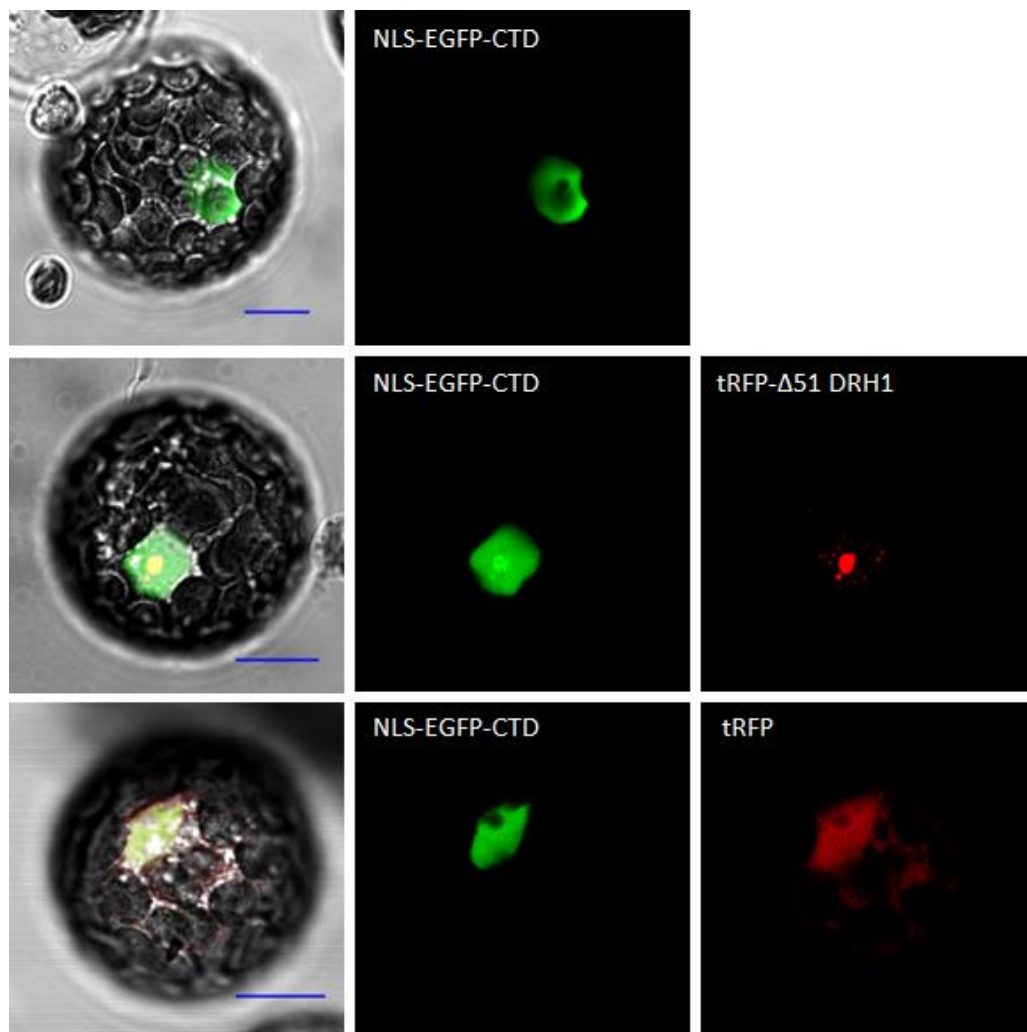
Rycina 25. Analiza oddziaływania między białkiem fuzyjnym NLS-EGFP-CTD a helikazą DRH1 w fuzji z białkiem tRFP, przy użyciu techniki FRET-FLIM, w protoplastach *Arabidopsis thaliana*. Białko tRFP służyło jako kontrola negatywna eksperymentu. Czas fluorescencji donora wyrażony jest w nanosekundach. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM, ang. standard error of the mean). Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora w porównaniu do kontroli negatywnej tRFP) sprawdzoną za pomocą testu Mann–Whitney–Wilcoxon – (*<0.001).

Domena WW u DRH1 zlokalizowana jest między 17 a 51 aminokwasem tego białka. By sprawdzić istotność domeny WW dla oddziaływania DRH1 z domeną CTD RNAPII, postanowiono przygotować krótszą wersję białka DRH1 pozbawioną 51 aminokwasów z części N-końcowej tego białka ($\Delta 51$ DRH1) w fuzji z białkiem tRFP. Następnie ponownie posłużono się mikroskopią konfokalną i techniką FRET-FLIM do analizy lokalizacji komórkowej przygotowanego białka fuzyjnego oraz zbadania oddziaływania pomiędzy badanymi białkami. Analizy wykazały, że tRFP- $\Delta 51$ DRH1, podobnie jak białko pełnej długości, lokalizuje w jądrze komórkowym i jąderku (ryc. 26).

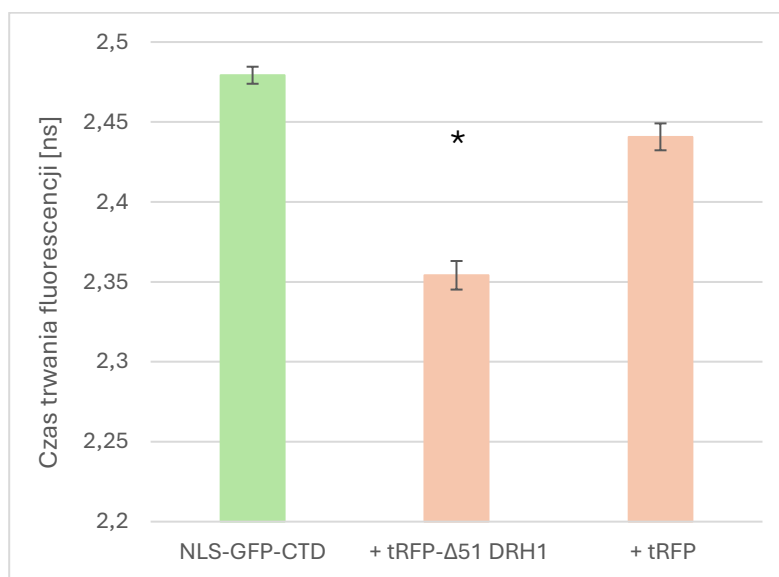


Rycina 26. Lokalizacja komórkowa helikazy DRH1 pozbawionej domeny WW. Skala = 10 μ m.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem protoplastów kotransfekowanych wektorami zawierającymi sekwencję kodującą tRFP- $\Delta 51$ DRH1 oraz EGFP-CTD pokazały, że tRFP- $\Delta 51$ DRH1 współwystępuje z EGFP-CTD w jądrze komórkowym i jąderku (ryc. 27). Pomiar czasu trwania fluorescencji donora, którym podobnie jak we wcześniejszym eksperymencie było białko EGFP w fuzji z domeną CTD RNAPII, uległ skróceniu w obecności tRFP- $\Delta 51$ DRH1. Czas trwania fluorescencji nie uległ natomiast zmianie w obecności białka tRFP, który stanowi kontrolę negatywną tego eksperymentu (ryc. 28). Zebrane wyniki sugerują, że domena WW helikazy DRH1 nie jest istotna dla oddziaływania DRH1 z domeną CTD RNAPII.



Rycina 27. Kolokalizacja białka fuzyjnego NLS-EGFP-DRH1 z tRFP-Δ51 DRH1 oraz tRFP (kontrola negatywna w eksperymencie FRET-FLIM). Zdjęcia przedstawiają transfekowane protoplasty *Arabidopsis thaliana*. Skala = 10μm.

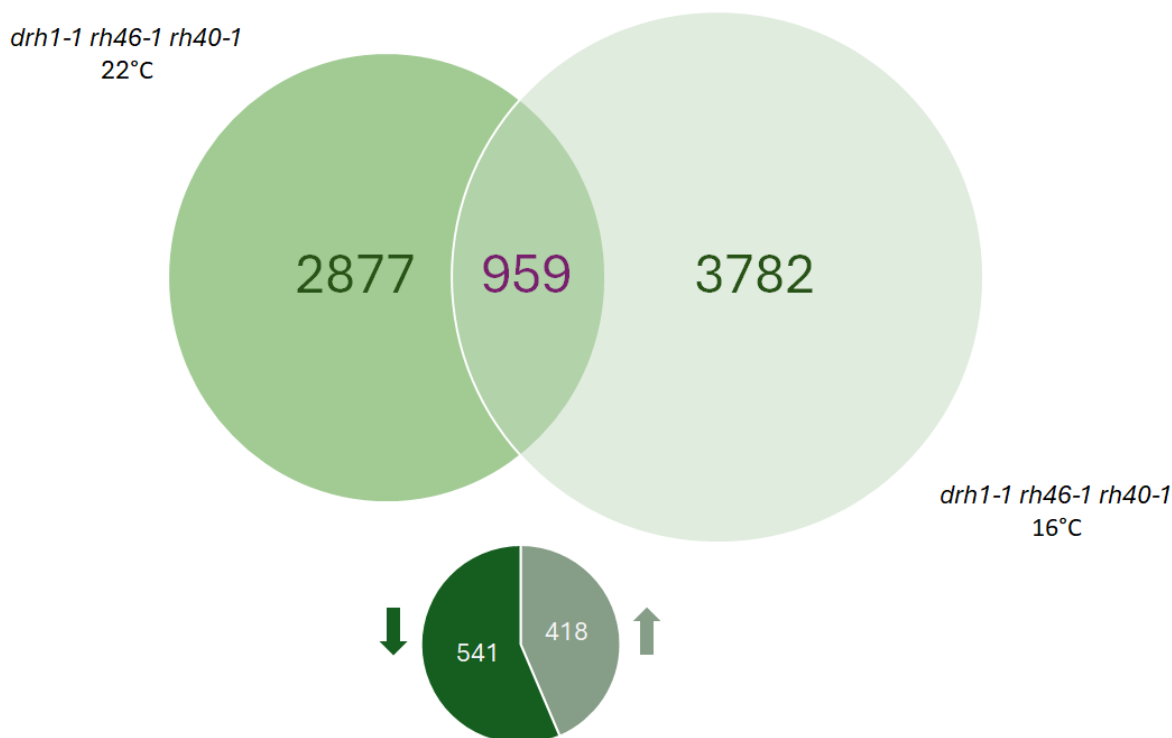


Rycina 28. Analiza oddziaływania między białkiem fuzyjnym NLS-EGFP-CTD a helikazą DRH1 pozbawioną domeny WW ($\Delta 51$ DRH1) w fuzji z białkiem tRFP, przy użyciu techniki FRET-FLIM w protoplastach *Arabidopsis thaliana*. Białko tRFP służyło jako kontrola negatywna eksperymentu. Czas fluorescencji donora wyrażony jest w nanosekundach. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM, ang. standard error of the mean). Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora w porównaniu do kontroli negatywnej (tRFP) obliczoną za pomocą testu Mann–Whitney–Wilcoxon – (* <0.001).

5.6. Analiza transkryptomu mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*

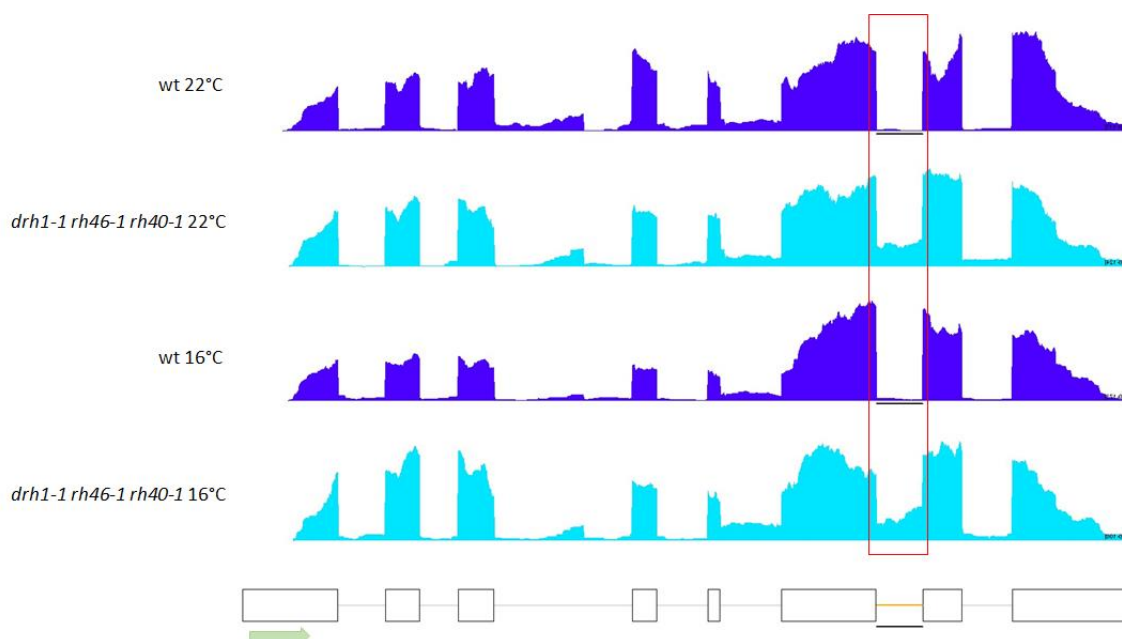
W następnej części pracy zdecydowano o przeprowadzeniu globalnej analizy transkryptomu mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C i 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego, w trzech powtórzeniach biologicznych. Pracę rozpoczęto od izolacji RNA, którego jakość sprawdzono testując współczynnik RIN. RNA oczyszczono z rRNA, a następnie użyto go do przygotowania bibliotek, które zbadano poprzez sekwencjonowanie nowej generacji (RNA-seq).

Następnie zbadano liczbę genów, których poziom wzrósł lub zmniejszył się w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z typem dzikim w obu temperaturach. Analiza wykazała, że zmianie uległ poziom 2877 genów w mutancie hodowanym w temperaturze 22°C oraz 3782 genów w mutancie hodowanym w 16°C. Różnica ta jest najprawdopodobniej wynikiem reakcji roślin na obniżoną temperaturę. Spośród genów o zmienionym poziomie u mutantu hodowanego w 22°C, poziom 1576 genów był podwyższony, a 1297 obniżony w porównaniu z rośliną typu dzikiego. U mutantu hodowanego w 16°C, poziom 1829 genów był podwyższony, a 1950 był obniżony w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Spośród genów o podwyższonym poziomie ekspresji, 418 było wspólnych dla obu warunków temperaturowych. W przypadku genów o obniżonej ekspresji 541 transkrypty miały podwyższony poziom w roślinach hodowanych zarówno w 22°C, jak i w 16°C (ryc. 29).



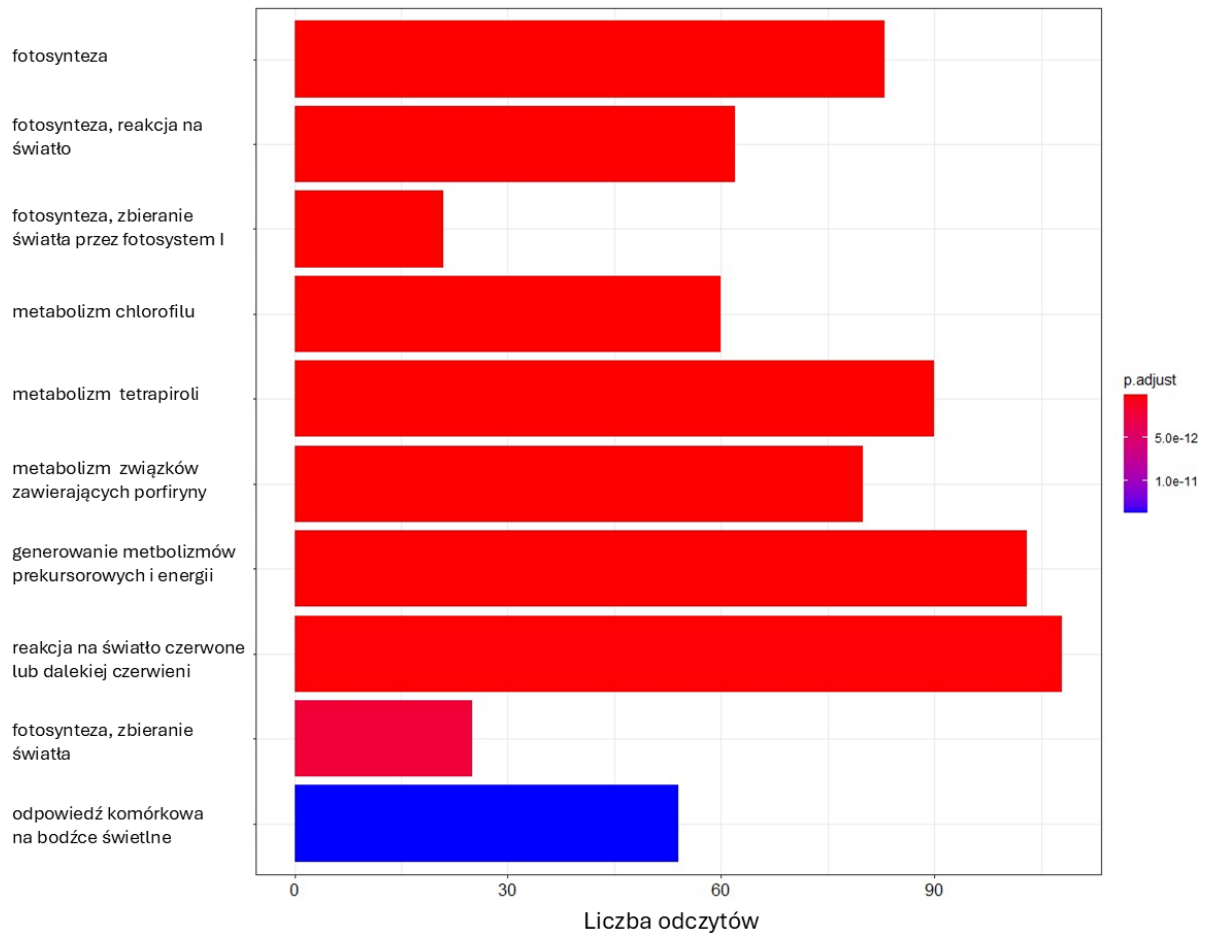
Rycina 29. Analiza transkryptomu mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40* za pomocą metody RNA-seq. Diagram Venna przedstawia porównanie genów o zmienionej ekspresji w *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanym w 22°C, z genami o zmienionej ekspresji w *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanym w 16°C. Wykres kołowy pokazuje liczbę genów o podwyższonej ekspresji (oznaczone strzałką w górę) oraz liczbę genów o obniżonej ekspresji (oznaczone strzałką w dół) wspólne dla mutantów rosnących w różnych warunkach temperaturowych.

W kolejnym kroku postanowiono sprawdzić, czy brak helikaz DRH1, RH46 i RH40 ma wpływ na splicing pre-mRNA. Przeprowadzone analizy wykazały zmiany w splicingu 55 mRNA u *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanego w 22°C oraz w 62 mRNA w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Zdecydowaną większość zaobserwowanych przeze mnie zmian u potrójnych mutantów *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych stanowiło zatrzymanie intronów. Dla mutantów hodowanych w 22°C zatrzymanie intronów stanowiło 48% wszystkich zmian splicingowych, a dla mutantów hodowanych w obniżonej temperaturze było to prawie 52% wszystkich zmian. Przykładem genu, u którego zaobserwowano zatrzymanie intronu jest AT3G55910. Koduje on niewielkie białko aktywujące GTPazę czynnika ADP-rybozylacji. Zatrzymanie intronu w mRNA AT3G55910 wykryto w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w obu warunkach temperaturowych (ryc. 30). Poziom transkryptu AT3G55910 w *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanym w 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego był obniżony, podczas gdy u roślin hodowanych w standardowych warunkach poziom tego transkryptu nie uległ zmianie.

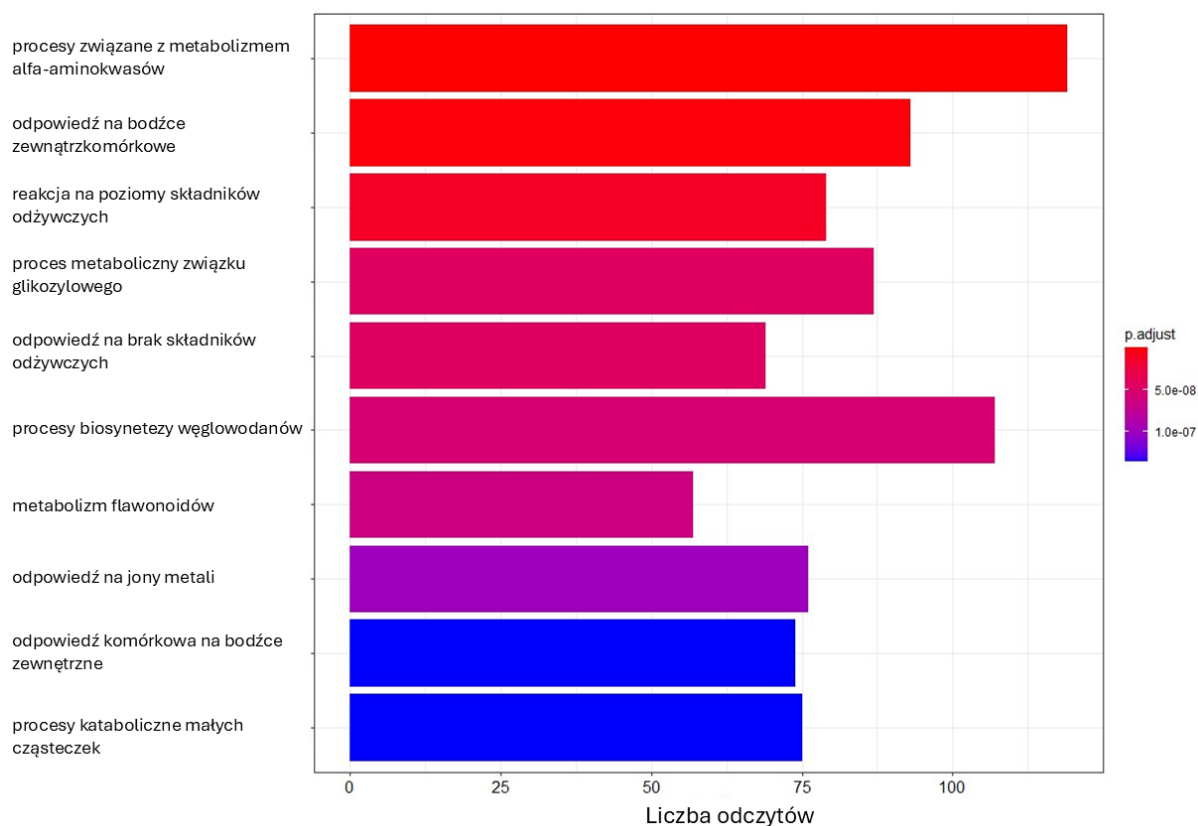


Rycina 30. Zmiany w splicingu transkryptu genu AT3G55910 w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C oraz 16°C. Czerwoną ramką zaznaczono intron ulegający zatrzymaniu w *drh1-1 rh46-1 rh40*. Zielona strzałka reprezentuje kierunek transkrypcji genu.

Następnie przeprowadzono analizę GO (ang. *gene ontology*) by sklasyfikować geny o zmienionej ekspresji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* na podstawie funkcji i procesów biologicznych, w które są zaangażowane. Analizy wykazały, że zmianom w potrójnym mutancie helikazowym w 22°C ulegały przede wszystkim geny związane z takimi procesami biologicznymi jak fotosynteza, zbieranie światła, reakcje na światło oraz odpowiedź na światło czerwone i dalekiej czerwieni (ryc. 31). U mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C zmieniał się natomiast poziom genów związanych głównie z odpowiedziami na poziomy i niedobory składników odżywczych, odpowiedziami na bodźce pochodzące spoza komórki i jony metali (ryc. 32).

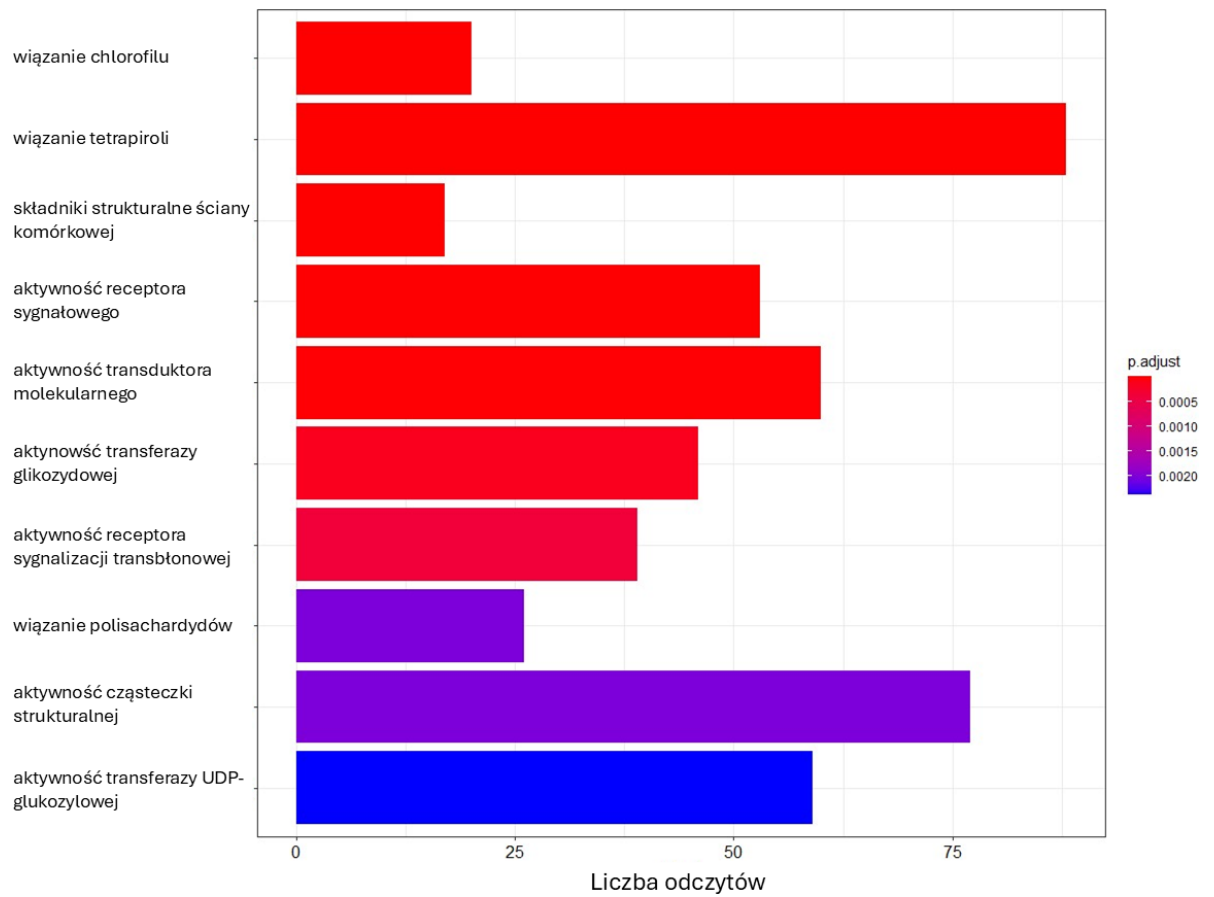


Rycina 31. Wyniki analizy GO (ang. gene ontology) w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Geny o zmienionej ekspresji zostały sklasyfikowane na podstawie procesu biologicznego, w które są zaangażowane.

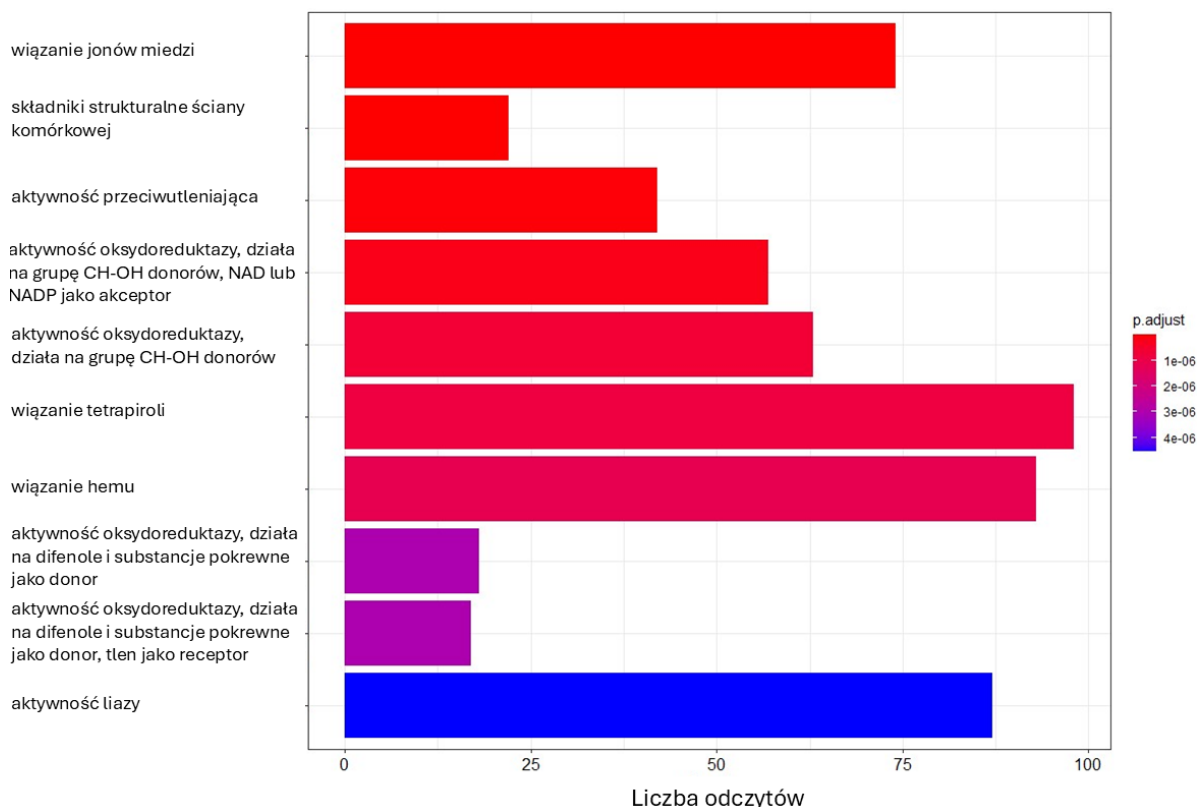


Rycina 32. Wyniki analizy GO (ang. gene ontology) w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Geny o zmienionej ekspresji zostały sklasyfikowane na podstawie procesu biologicznego, w które są zaangażowane.

Ponadto, analizy funkcji molekularnych genów o zróżnicowanej ekspresji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wykazały, że u mutantów hodowanych w 22°C zmianom ekspresji ulegały przede wszystkim geny zaangażowane w wiązanie chlorofilu, tetrapiroli i polisacharydów oraz biorące udział w przekazywaniu sygnałów (ryc. 33). U mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C zmieniał się z kolei głównie poziom genów związanych z wiązaniem tetrapiroli, hemu i miedzi, a także genów, których produkty posiadają aktywność oksydoreduktazy (ryc. 34).



Rycina 33. Wyniki analizy GO (ang. gene ontology) w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Geny o zmienionej ekspresji zostały sklasyfikowane na podstawie funkcji molekularnej, którą pełnią.



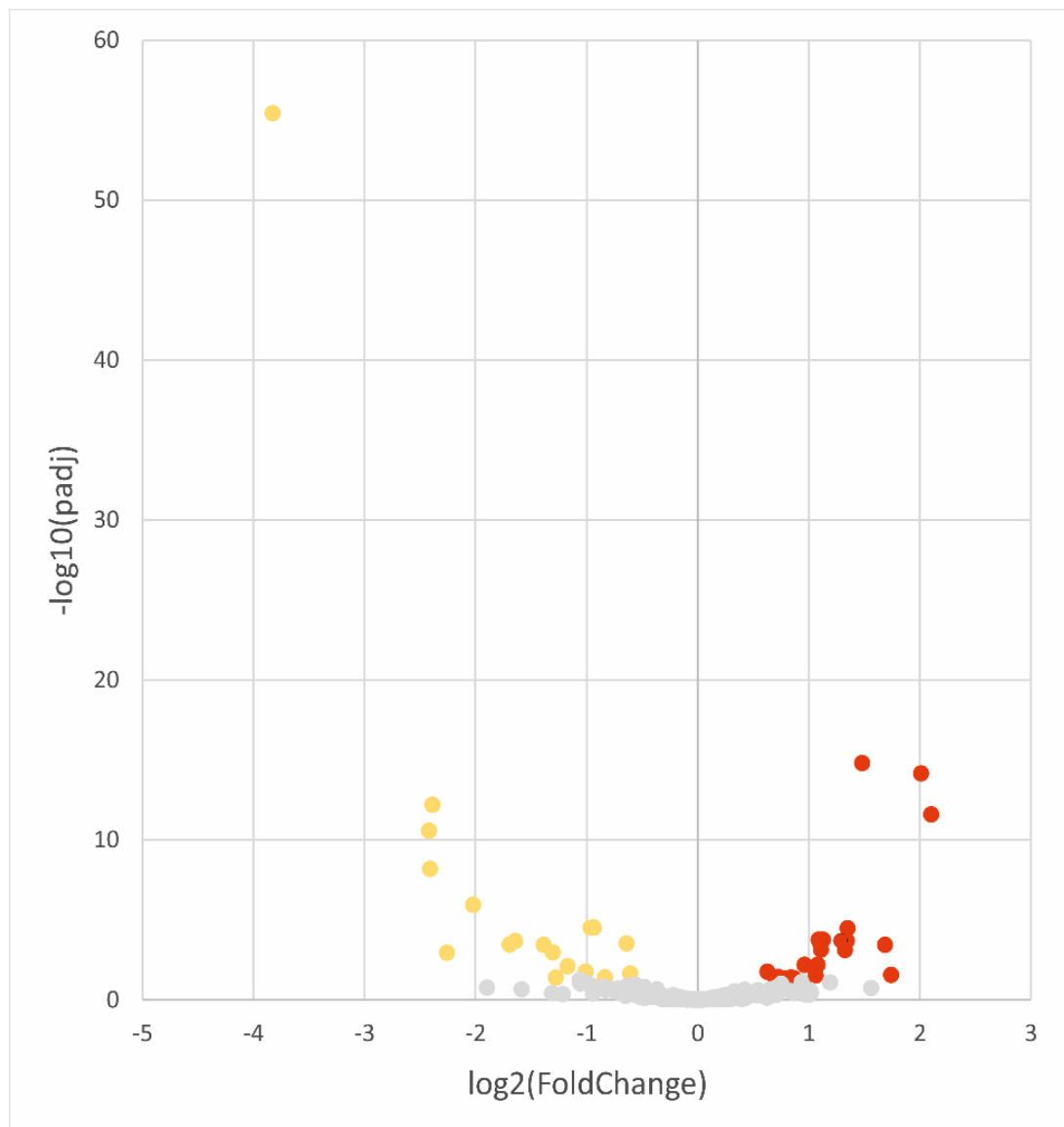
Rycina 34. Wyniki analizy GO (ang. gene ontology) w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Geny o zmienionej ekspresji zostały sklasyfikowane na podstawie funkcji molekularnej, którą pełnią.

Podsumowując, analizy wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA wykazały zmiany w poziomie ekspresji kilku tysięcy genów w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C i 16°C. Geny o zmienionej ekspresji w mutancie badanych helikaz są przede wszystkim związane z fotosyntezą, reakcjami rośliny na czynniki zewnętrzne oraz wiązanie i metabolizm związków biologicznych.

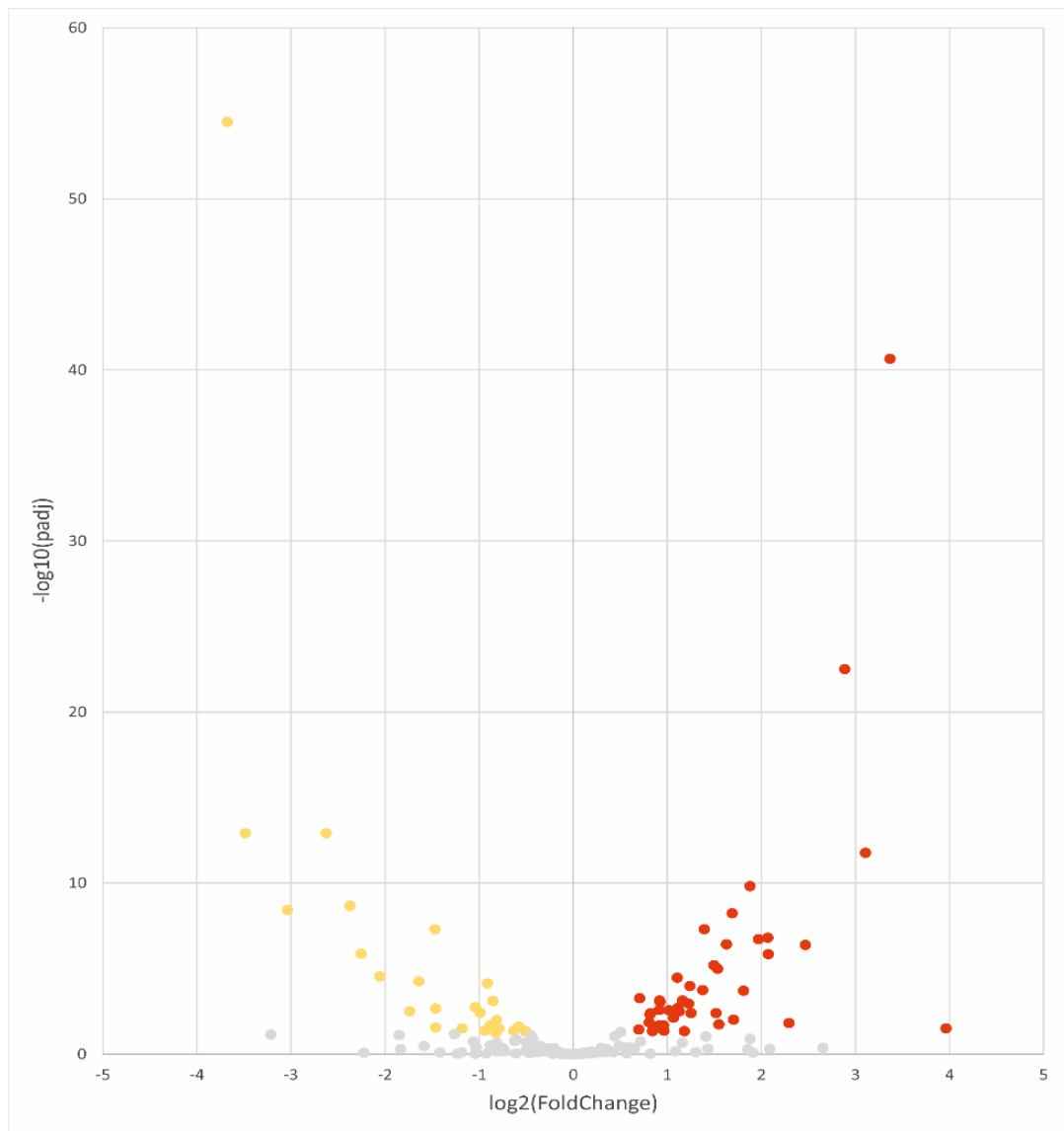
5.7. Globalna analiza miRNA u potrójnego mutantu helikazowego *drh1-1 rh46-1 rh40-1*

W celu sprawdzenia wpływu helikaz DRH1, RH46 i RH40 na biogenezę miRNA u *Arabidopsis* przeprowadzono globalną analizę małych RNA poprzez sekwencjonowanie nowej generacji (sRNA-seq). Do tego eksperymentu wykorzystano mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* i rośliny typu dzikiego hodowane w standardowych (22°C) i zmienionych warunkach (16°C) hodowli, pochodzących z trzech powtórzeń biologicznych. RNA wyizolowano, a jego jakość sprawdzono testując współczynnik RIN (ang. *RNA integrity number*). Podczas analizy bioinformatycznej wyników sekwencjonowania RNA skoncentrowano się przede wszystkim na dojrzałych miRNA.

Analiza wyników sekwencjonowania nowej generacji wykazały zmiany w poziomach części dojrzałych miRNA w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych w porównaniu do roślin typu dzikiego. U roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w standardowych warunkach hodowli (22°C) zaobserwowano zmianę w poziomach 41 różnych miRNA: poziom 18 miRNA był obniżony, natomiast poziom 23 miRNA był znacząco podwyższony (ryc. 35). W przypadku roślin hodowanych w obniżonej temperaturze (16°C) zauważono zmianę w poziomach 69 miRNA: poziom 26 miRNA był obniżony, a 43 miRNA podwyższony (ryc. 36). Co ciekawe, chociaż liczba miRNA o obniżonym poziomie nie zmieniła się znacząco pomiędzy roślinami potrójnego mutantu hodowanych w różnych warunkach temperaturowych, to liczba miRNA o podwyższonym poziomie wzrosła prawie dwukrotnie u mutantu hodowanego w 16°C w porównaniu z mutantem rosnącym w warunkach standardowych (22°C). Największe obniżenie poziomu w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych zaobserwowano dla miR843. Rola miR843 nie jest jeszcze poznana. Najwyższej ekspresji miR843 ulega kolejno w liściach rozety roślin, u których otwiera się pierwszy kwiat oraz w liściach rozety 3-tygodniowych roślin. Najwyższą akumulację w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych odnotowano natomiast dla miR845a, który ulega ekspresji przez całe życie rośliny we wszystkich jej tkankach (118). Funkcja miR845a również nie jest jeszcze zbadana. Niektóre z miRNA, których poziom zmienia się znacząco w 16°C, nie wykazują istotnej statystycznie zmiany u mutantów hodowanych w 22°C. Znajdują się one jednak blisko progu istotności statystycznej i wykazują tę samą tendencję, co u roślin hodowanych w niższej temperaturze.



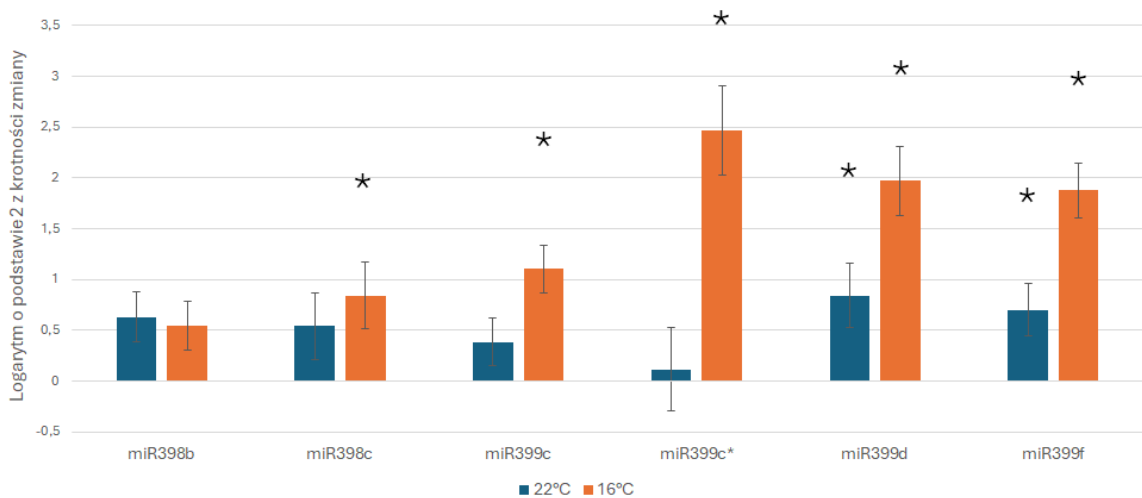
Rycina 35. Zmiany w poziomach miRNA w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanym w 22°C w porównaniu do rośliny typu dzikiego. Na żółto zaznaczono miRNA, których poziom był obniżony, na czerwono zaznaczono miRNA wykazujące podwyższony poziom w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Szare kropki reprezentują miRNA, których poziom zmienił się w sposób statystycznie nieistotny.



Rycina 36. Zmiany w poziomach miRNA w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanym w 16°C w porównaniu do rośliny typu dzikiego. Na żółto zaznaczono miRNA, których poziom był obniżony, na czerwono zaznaczono miRNA wykazujące podwyższony poziom w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Szare kropki reprezentują miRNA, których poziom zmienił się w sposób statystycznie nieistotny.

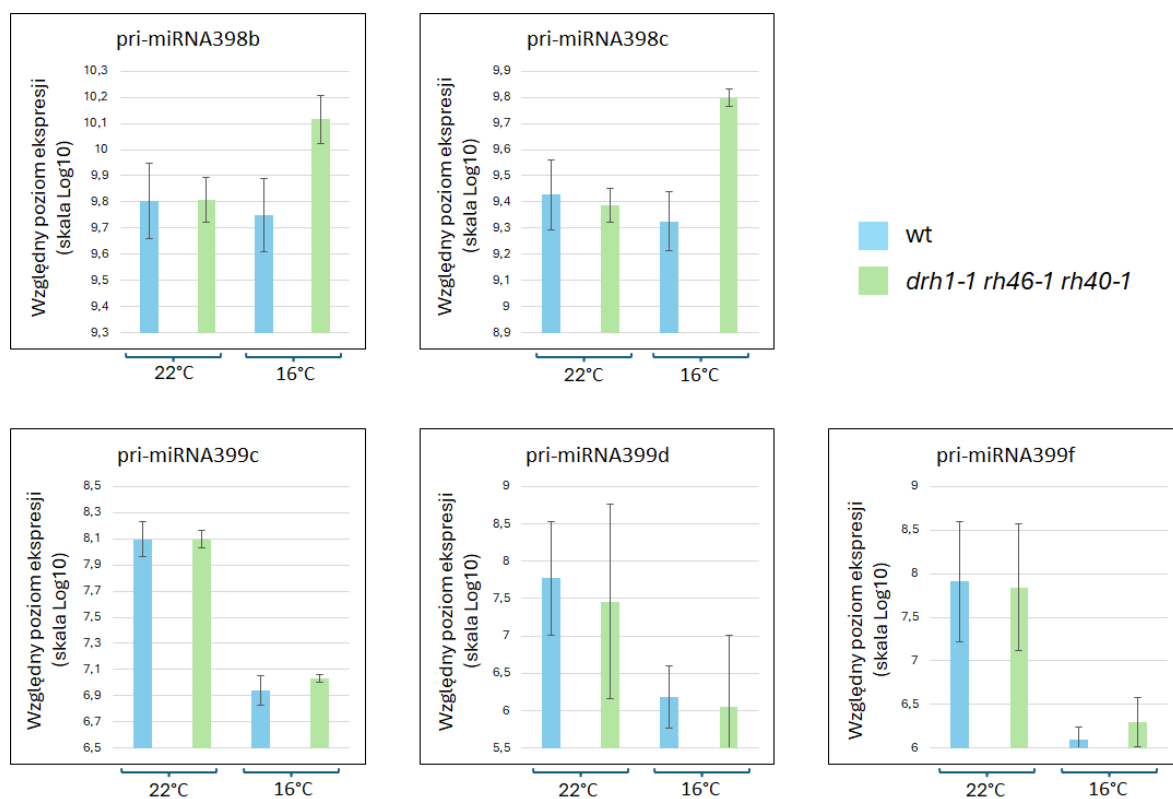
W kolejnym kroku postanowiono przeanalizować poziom wyselekcjonowanych pri-miRNA. W tym celu posłużono się najpierw wynikami sekwencjonowania nowej generacji. Skoncentrowano się przede wszystkim na poziomie prekursorów tych miRNA, które akumulują w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C i 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Niestety, przez niski poziom prekursorów w komórce oraz głębokość sekwencjonowania nie udało się przeanalizować poziomów wszystkich wybranych pri-miRNA. W celu zbadania poziomów wybranych pri-miRNA posłużono się zatem metodą qPCR. Za pomocą tej metody sprawdzono poziom pięciu pri-miRNA: pri-miR398b, pri-

miR398c, pri-miR399c, pri-miR399d i pri-miR399f. Poziom miR399c jest podwyższony w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* tylko u roślin hodowanych w 16°C porównaniu z rośliną typu dzikiego. U mutantów hodowanych w 22°C poziom tego miRNA nie ulega zmianie. Podwyższeniu w obu warunkach temperaturowych ulega jednak poziom miR399c*. Poziomy miR399d i miR399f zmieniają się natomiast w roślinie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Poziomy miR398b i miR398c ulegają podwyższeniu w obu warunkach temperaturowych w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Jest to jednak zmiana nieistotna statystycznie (ryc. 37).



Rycina 37. Poziomy wyselekcjonowanych miRNA w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Wyniki uzyskane za pomocą sekwencjonowania nowej generacji małych RNA. Na niebiesko oznaczono *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C, na pomarańczowo oznaczono *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C. Na osi y zaznaczono logarytm o podstawie 2, opisujący krotność zmian względem próby kontrolnej. Gwiazdką zaznaczono zmiany istotne statystycznie. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

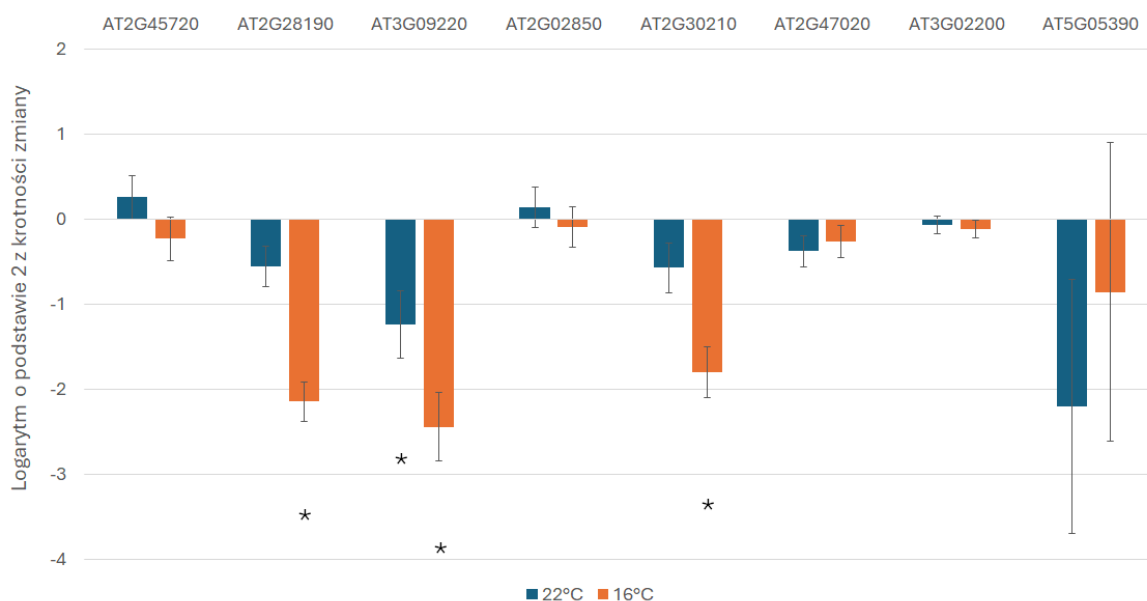
Analizy qPCR wykazały, że poziom pri-miR399c nie ulega zmianie w potrójnym mutancie helikazowym hodowanym w 22°C i 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego (ryc. 38). Podobne wyniki uzyskano dla miR399d i miR399f. Poziomy prekursorów tych cząsteczek nie uległy zmianie w roślinie mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w żadnym z badanych warunków temperaturowych w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Analizy poziomu pri-miR398b i pri-miR398c pokazały, że w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C poziomy tych prekursorów nie zmieniają się w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Jednakże u mutantu hodowanego w 16°C poziomy pri-miR398b i pri-miR398c wzrastają w porównaniu z rośliną typu dzikiego (ryc. 38).



Rycina 38. Akumulacja wybranych prekursorów w *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanym w 22°C i 16°C. Wykresy przedstawiają poziomy prekursorów względem rośliny typu dzikiego (*wt*) hodowanych w tych samych warunkach temperaturowych z użyciem PCR w czasie rzeczywistym. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy. Na osi y przedstawiono logarytm dziesiętny z ekspresji genu.

Następnie sprawdzono poziom docelowych mRNA wyselekcjonowanych miRNA, których poziom wzrósł w roślinie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanej w obu warunkach temperaturowych w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Do analiz wykorzystano dane z wysokoprzepustowego sekwencjonowania długich RNA. Analizy wykazały występowanie statystycznie istotnych zmian tylko w przypadku transkryptu AT3G09220, będącego mRNA docelowym miRNA408. Poziom tego mRNA uległ obniżeniu w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w obu warunkach temperaturowych w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Oprócz tego zaobserwowano istotnie statystyczną zmianę poziomów jeszcze dwóch mRNA docelowych: AT2G28190 oraz AT2G30210, kontrolowanych odpowiednio przez miRNA857 oraz miRNA408. Poziom obu tych transkryptów uległ obniżeniu w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. W pozostałych przypadkach zaobserwowano nieistotne statystycznie obniżenie poziomów mRNA. Wyjątek stanowią mRNA AT2G45720 oraz AT2G02850, kontrolowane odpowiednio przez miRNA398a oraz miRNA408, których poziom nie uległ obniżeniu w

mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego (ryc. 39).



Rycina 39. Zmiany w poziomach mRNA docelowych wyselekcjonowanych miRNA Kolorem niebieskim oznaczono mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanego w 22°C, kolorem pomarańczowym oznaczono mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40* hodowanego w 16°C. Na osi y logarytm o podstawie 2, opisujący krotność zmian względem próby kontrolnej. Gwiazdką zaznaczono zmiany statystycznie istotne. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Przeprowadzone analizy w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40* pokazują zmiany w poziomach dojrzałych cząsteczek miRNA. Wykazano, że u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C podwyższeniu ulega poziom 23 miRNA, a obniżeniu 18 miRNA w porównaniu z rośliną typu dzikiego. U potrójnego mutantu helikazowego hodowanego w 16°C podwyższeniu ulega poziom 43 miRNA, a obniżeniu 26 miRNA porównaniu z rośliną typu dzikiego.

5.8. Badanie struktury drugorzędowej wyselekcjonowanych pri-miRNA

Opublikowane dane pokazują, że struktura prekursorów ma wpływ na wydajność i efektywność ich obróbki (65-70). W niniejszej pracy zademonstrowano zmianę w poziomach szeregu dojrzałych miRNA w roślinach *drh1-1 rh46-1 rh40-1* bez jednoczesnych zmian w poziomach kodujących je pierwotnych transkryptów. Wynik ten może sugerować zaangażowanie helikaz w biogenezę miRNA na etapie potranskrypcyjnym. Helikazy z rodziny DEAD-box zostały opisane jako białka opiekuńcze RNA wpływające na ich strukturę (78). W ramach niniejszej pracy postanowiono zatem sprawdzić, czy helikazy DRH1, RH46 i RH40 mają wpływ na strukturę pre-miRNA *in vivo*. W tym celu

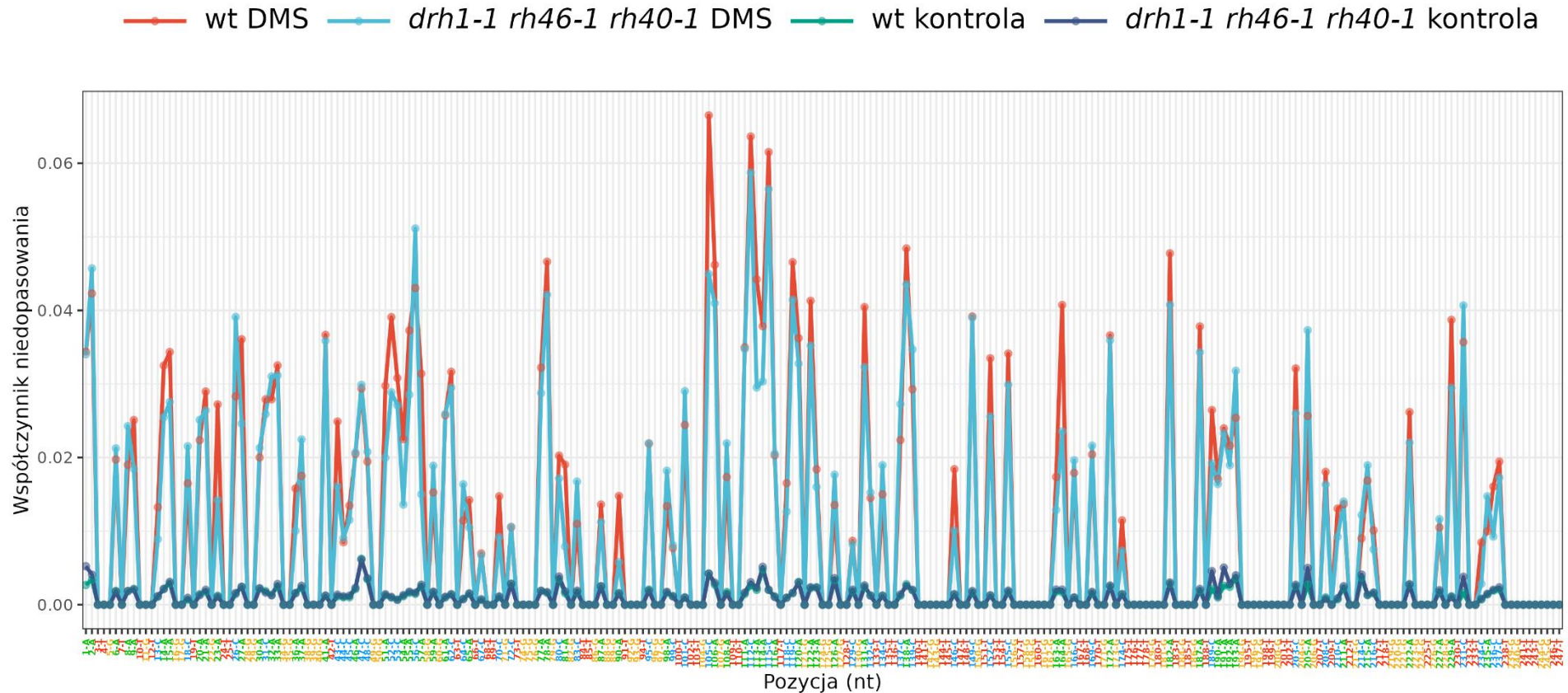
zoptymalizowano technikę celowanego DMS-MaPseq, która została opisana przez Wang i współpracowników i umożliwia zbadanie struktury tylko wybranych RNA (59). Dwutygodniowe siewki *Arabidopsis* poddano działaniu siarczanu (VI) dimetylu (DMS), który metyluje adeniny (A) i cytozyny (C) w jednoniciowych fragmentach RNA, takich jak pętle, wyrzuszenia czy niesparowane zasady. Z roślin tych wyizolowano RNA, a następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy kodowanej przez intron grupy II, która w miejsce metylowanych zasad wprowadza przypadkowe nukleotydy. Do odwrotnej transkrypcji użyto także startery komplementarne do sekwencji wybranych prekursorów. W ten sposób przepisano na cDNA tylko sekwencje wybranych prekursorów. Przygotowane cDNA wykorzystano do przeprowadzenia reakcji PCR ponownie używając starterów komplementarnych do sekwencji wybranych prekursorów. Otrzymane produkty PCR użyto do przygotowania bibliotek. Ponieważ prekursory miRNA występują w komórkach na niskim poziomie skoncentrowano się na zbadaniu struktury prekursorów, które kodują miRNA o podwyższonym poziomie w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*: pre-miR398b, pre-miR398c, pre-miR399c, pre-miR399d, pre-miR827, pre-miR2111a, pre-miR2112 i pre-miR3434. Ponadto, zdecydowano o sprawdzeniu struktury pre-miR822, którego poziom dojrzałego miRNA jest obniżony w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Do sprawdzenia wybrano także pre-miR159b, pre-miR160a, pre-miR166a oraz pre-miR168a. Są to prekursory, których sekwencje zostały zbadane techniką DMS-MaPseq i zademonstrowane w publikacji Wang i współpracowników (59). Prekursory te wykorzystano jako kontrolę przebiegu całej procedury. Dodatkowo, zdecydowano o zbadaniu struktury mRNA *UBQ4*, która stanowiła kontrolę wykonania eksperymentu wybraną przez Wang i współpracowników, gdyż poziom tego transkryptu nie ulega zmianie w roślinie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*.

Pracę rozpoczęto od zaprojektowania staterów ukierunkowanych na sekwencje wyselekcjonowanych prekursorów. Startery zaprojektowano w taki sposób, by flankowały rejon spinki do włosów. Do eksperymentu wykorzystano roślinę typu dzikiego oraz mutant *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowane w 22°C oraz 16°C. Część zebranych roślin poddano działaniu DMS, pozostałe inkubowano bez dodatku tego odczynnika, co stanowiło kontrolę przeprowadzanego eksperymentu.

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, że udało się uzyskać wystarczającą liczbę odczytów dla sześciu z wybranych RNA: mRNA *UBQ4*, pre-miRNA160a, pre-miRNA166a, pre-miRNA399c, pre-miRNA2111a oraz pre-miRNA2112. W sekwencjach wszystkich otrzymanych RNA pochodzących z prób poddanych działaniu

DMS widoczne są znaczące różnice w porównaniu z próbami kontrolnymi, które nie zostały poddane działaniu tego odczynnika. Oznacza to, że DMS efektywnie zmodyfikował nukleotydy we fragmentach jednoniciowych RNA, które następnie zostały zastąpione innymi nukleotydami w czasie odwrotnej transkrypcji. W analizach posłużono się wartością współczynnika niedopasowania, który przedstawia liczbę niedopasowanych nukleotydów w sekwencji w porównaniu z referencyjną sekwencją tego RNA. Współczynnik ten przyjmuje wartości od 0 do 1, gdzie 0 oznacza, że nukleotyd w żadnym z odczytów nie został zastąpiony innym, a 1, że dany nukleotyd został zastąpiony innym w każdym z otrzymanych odczytów. W przypadku mRNA *UBQ4* nie zaobserwowaliśmy znacznych różnic w współczynniku niedopasowania (pomiędzy roślinami typu dzikiego a mutantem *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (ryc. 40, ryc. 41). W obu przypadkach tendencje współczynnika niedopasowania pozostały takie same. Oznacza to, że struktura tego mRNA nie uległa zmianie w roślinach *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C oraz 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego.

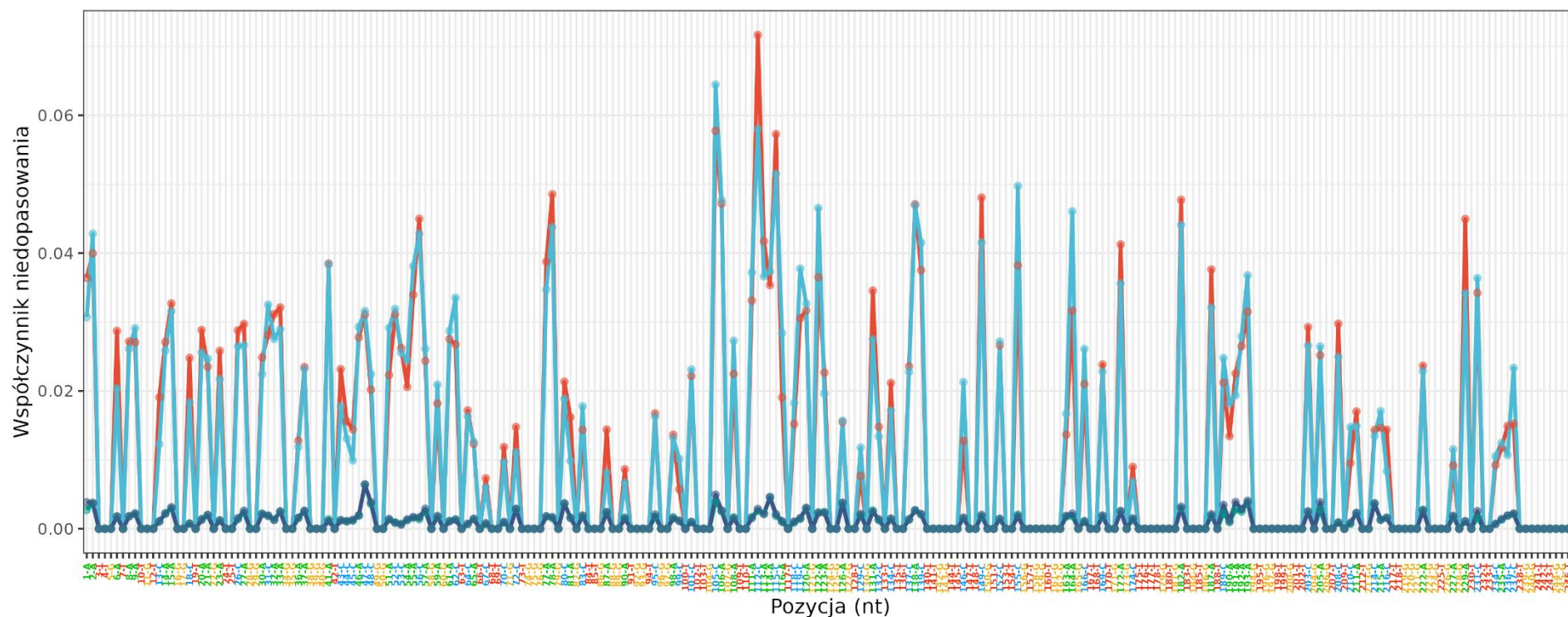
UBQ4 - 22 stopnie Celsjusa



Rycina 40. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania dla mRNA UBQ4 w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.

UBQ4 - 16 stopni Celsjusza

—●— wt DMS —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —●— wt kontrola —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola

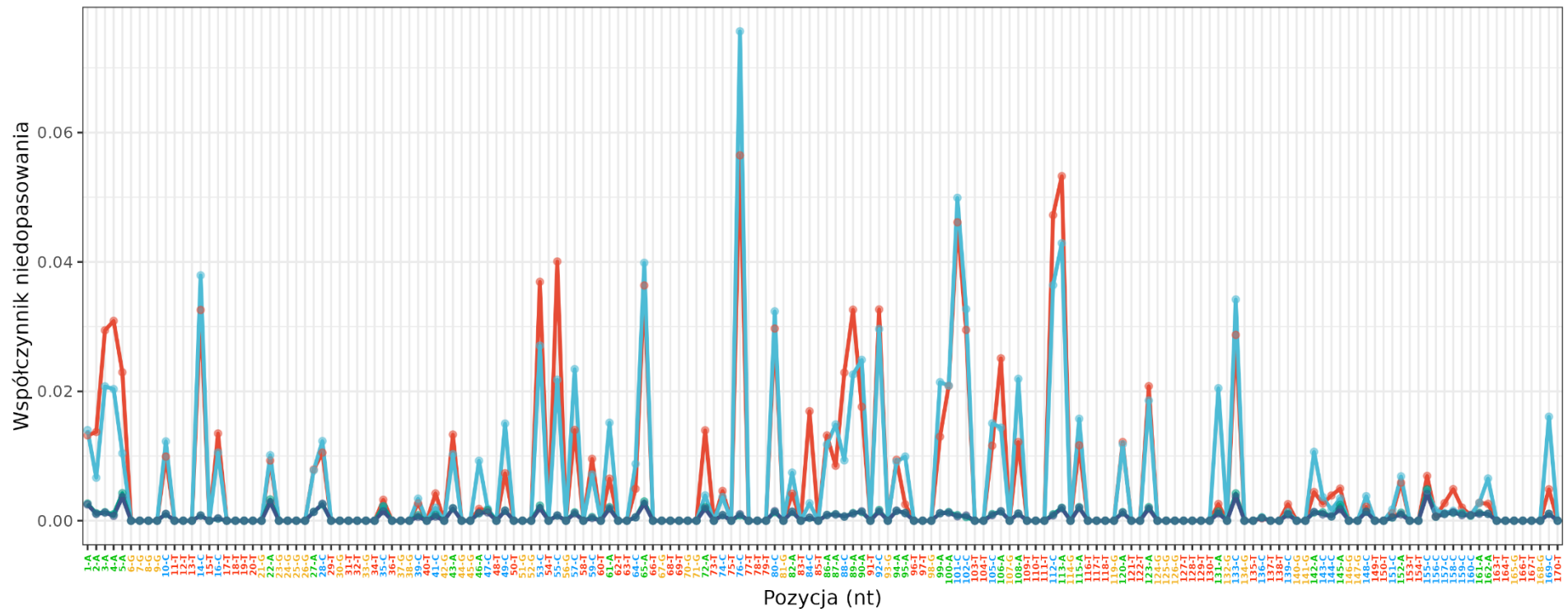


Rycina 41. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania dla mRNA UBQ4 w mutancie drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanym w 16°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin drh1-1 rh46-1 rh40-1. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny drh1-1 rh46-1 rh40-1, które nie zostały poddane działaniu DMS.

Analizę struktury drugorzędowej rozpoczęto od pre-miRNA166a. Poziom dojrzałej cząsteczki miR166a nie ulegał zmianie w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w żadnym z testowanych warunków temperaturowych w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Struktura tego prekursora została jednak zbadana w publikacji Wanga i współpracowników (59) i została wykorzystana w niniejszym eksperymencie jako dodatkowa kontrola wykonania eksperymentu. Analiza współczynnika niedopasowania po użyciu DMS w przypadku pre-miRNA166a nie wykazała występowania znaczących różnic u potrójnego mutantu helikazowego w porównaniu z rośliną typu dzikiego, a tendencje modyfikacji nukleotydów przez DMS zostały zachowane. Zaobserwowano jedynie niewielkie różnice w częstotliwości modyfikowania niektórych nukleotydów przez DMS w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z rośliną typu dzikiego (ryc. 42, ryc. 43). Następnie, modelowano struktury drugorzędowe pre-miRNA166a. W tym celu posłużono się wartością reaktywności DMS, czyli znormalizowanym współczynnikiem niedopasowania. Przewidziane struktury dla pre-miRNA166a z rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wykazywały zmiany w porównaniu z rośliną typu dzikiego w obu warunkach temperaturowych: dużej zmianie ulegała górna część prekursora umieszczona powyżej 64 nt. Zmianom nie podlegały fragmenty RNA od 19 do 64 nt oraz od 119 do 163 nt, które odpowiadają trzonowi spinki (ryc. 44, ryc. 45).

pre-miRNA166A - 22 stopnie Celsjusza

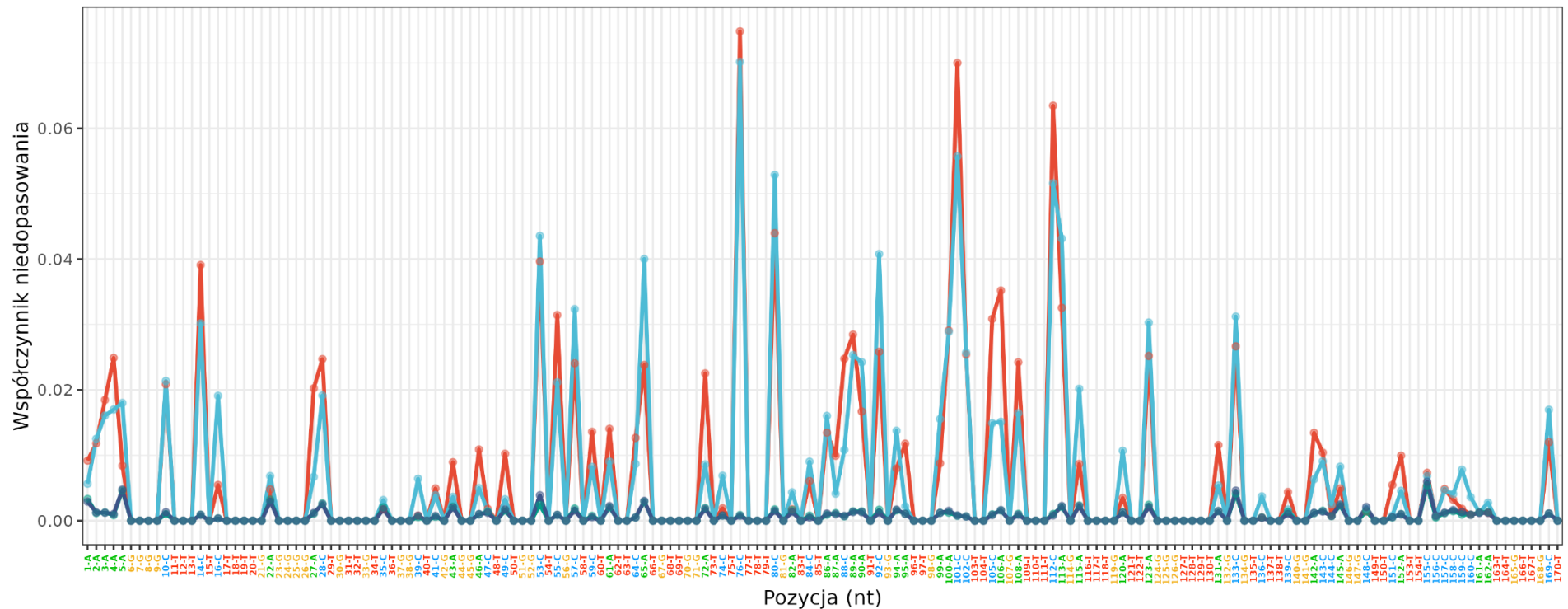
—•— wt DMS —•— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —•— wt kontrola —•— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola



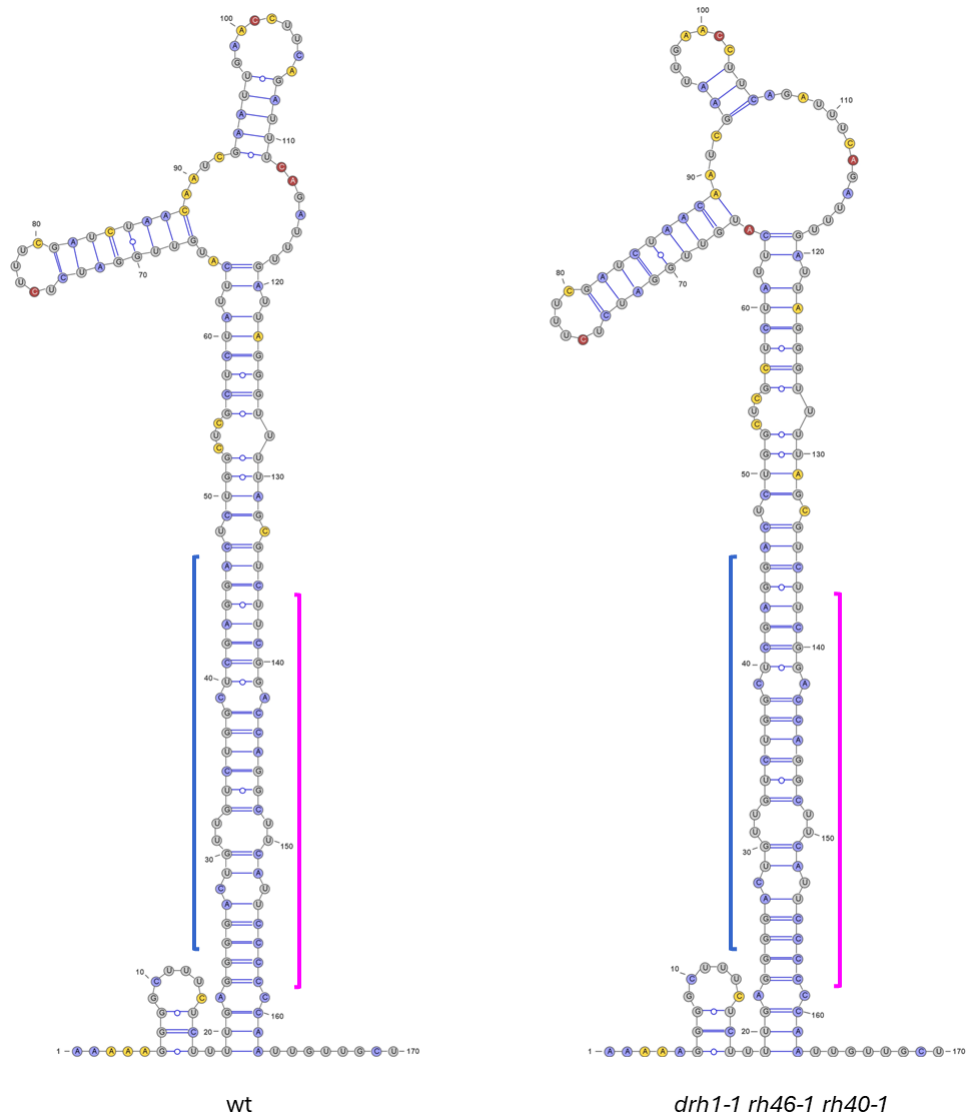
Rycina 42. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania dla pre-miRNA166a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.

pre-miRNA166A - 16 stopni Celsjusza

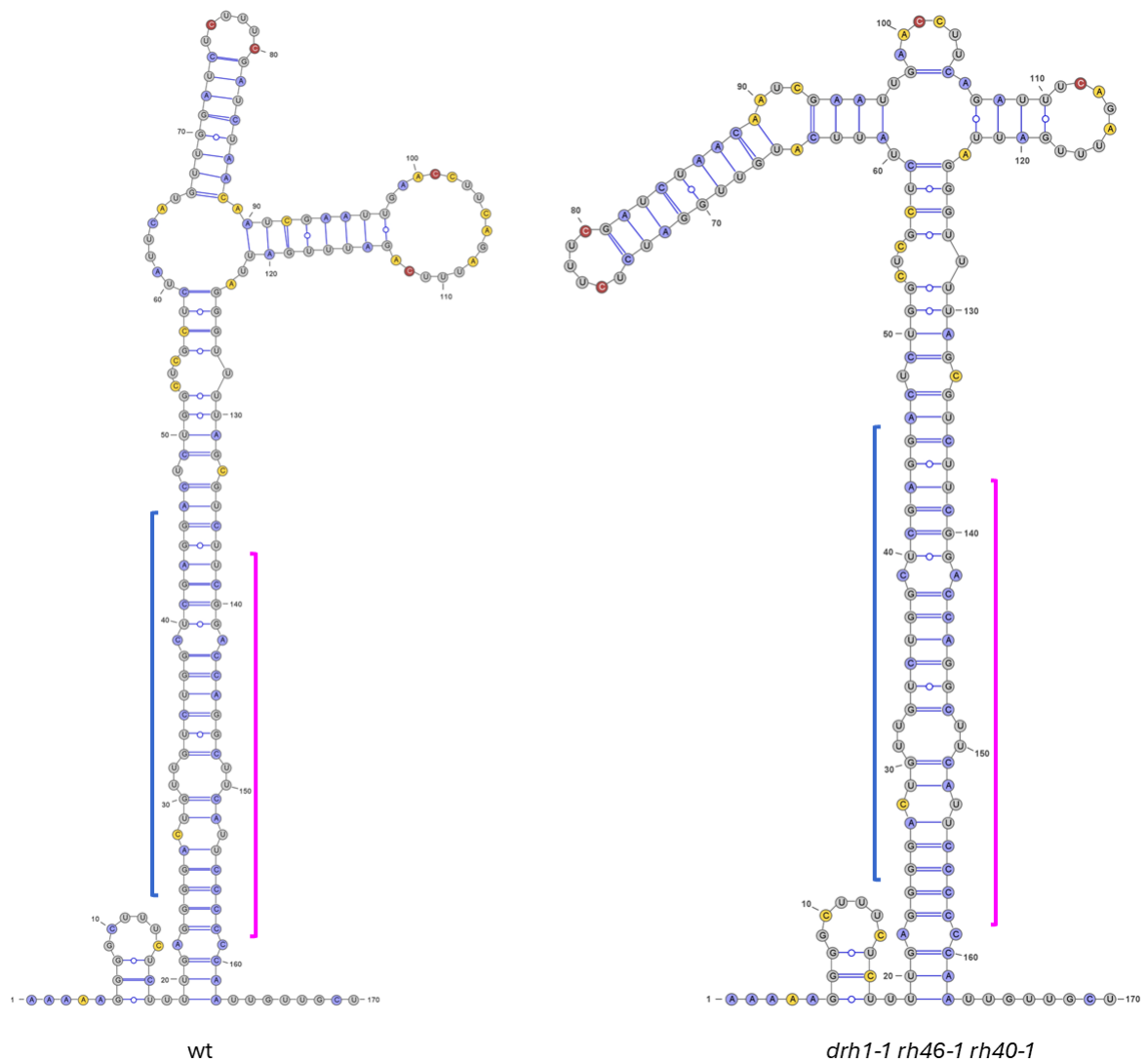
—●— wt DMS —●— *drh1-1 rh46-1 rh40-1* DMS —●— wt kontrola —●— *drh1-1 rh46-1 rh40-1* kontrola



Rycina 43. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania dla pre-miRNA166a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.



Rycina 44. Struktura pre-miRNA166a u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

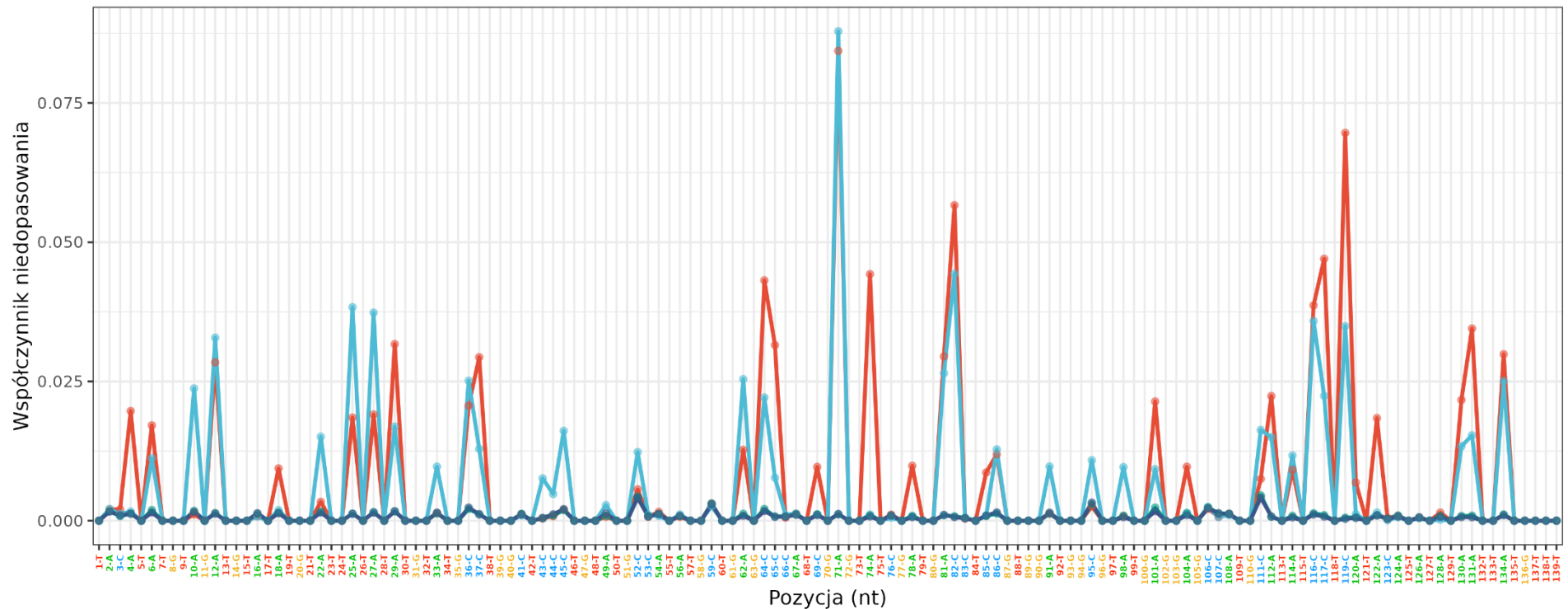


Rycina 45. Struktura pre-miRNA166a u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanych w 16°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

Następnie przeanalizowano współczynnik niedopasowania otrzymany po użyciu DMS w pre-miRNA160a u roślin typu dzikiego i mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C i 16°C. W potrójnym mutancie helikazowym hodowanym w 22°C poziom miRNA160* ulega podwyższeniu w porównaniu z rośliną typu dzikiego. U mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C poziom tej cząsteczki jest również podwyższony w porównaniu z rośliną typu dzikiego, jednak jest to zmiana nieistotna statystycznie. Struktura pre-miRNA160a została również zbadana przez Wanga i współpracowników (59). Analizy współczynnika niedopasowania wykazały zmiany w częstotliwości modyfikowania nukleotydów przez DMS w cząsteczce pre-miRNA160a szczególnie u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Adeniny w pozycjach 12, 16, 18, 22 oraz 29 nie ulegały modyfikacjom przez DMS w roślinie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, podczas gdy w roślinie typu dzikiego odnotowano częste modyfikacje tych nukleotydów. Dodatkowo, w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* zaobserwowano częste modyfikacje cytozyn w pozycjach 82 i 117, które w roślinie typu dzikiego nie były modyfikowane przez DMS (ryc. 46, ryc. 47). Struktury drugorzędowe przewidziane na podstawie danych z reaktywności DMS wykazały występowanie zmian w strukturze w dolnej części spinki prekursora. Pozostałe fragmenty prekursora nie ulegają zmianie w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z roślinami typu dzikiego (ryc. 48, ryc. 49).

pre-miRNA160A - 22 stopnie Celsjusza

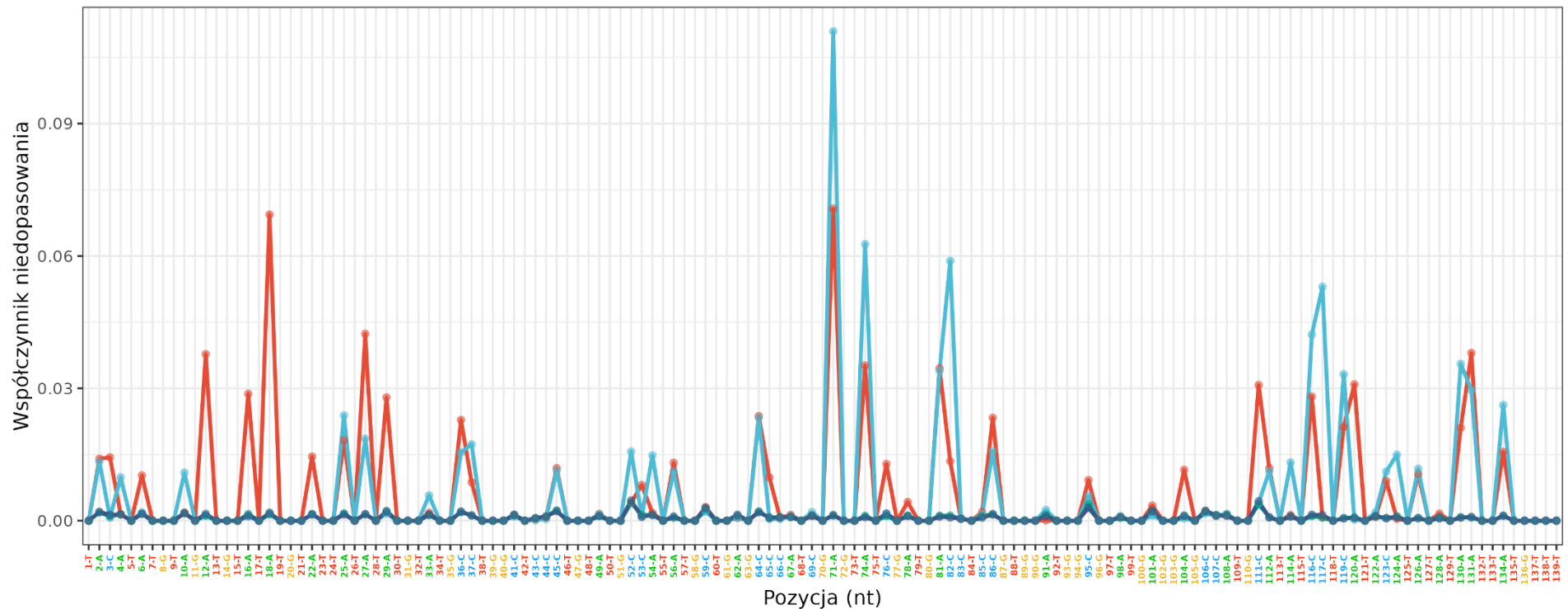
—●— wt DMS —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —●— wt kontrola —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola



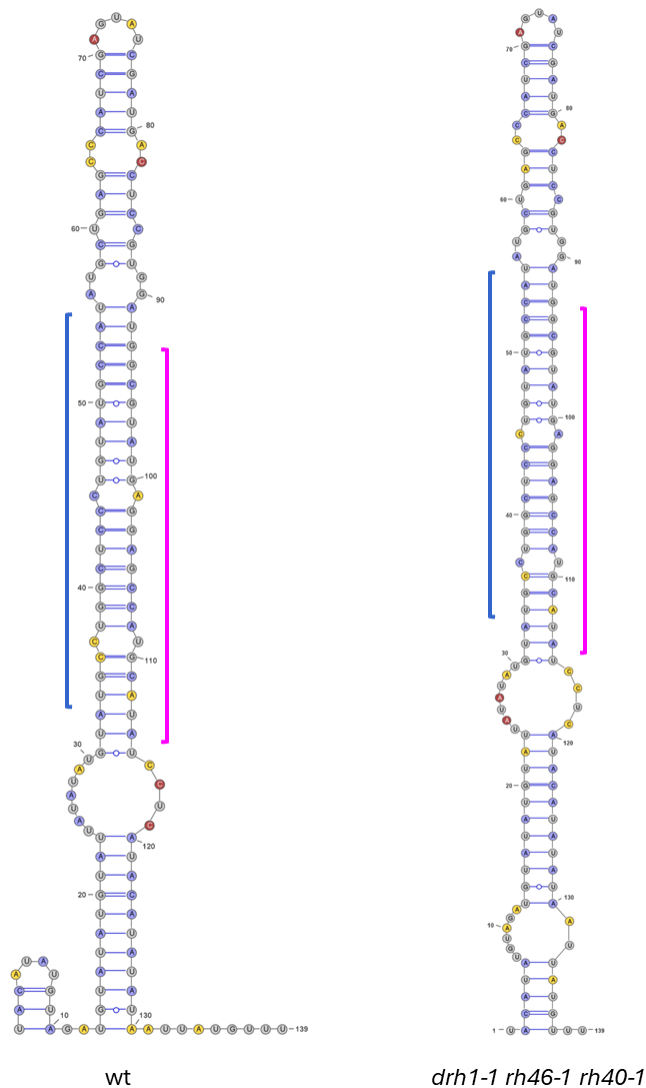
Rycina 46. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA160a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.

pre-miRNA160A - 16 stopni Celsjusza

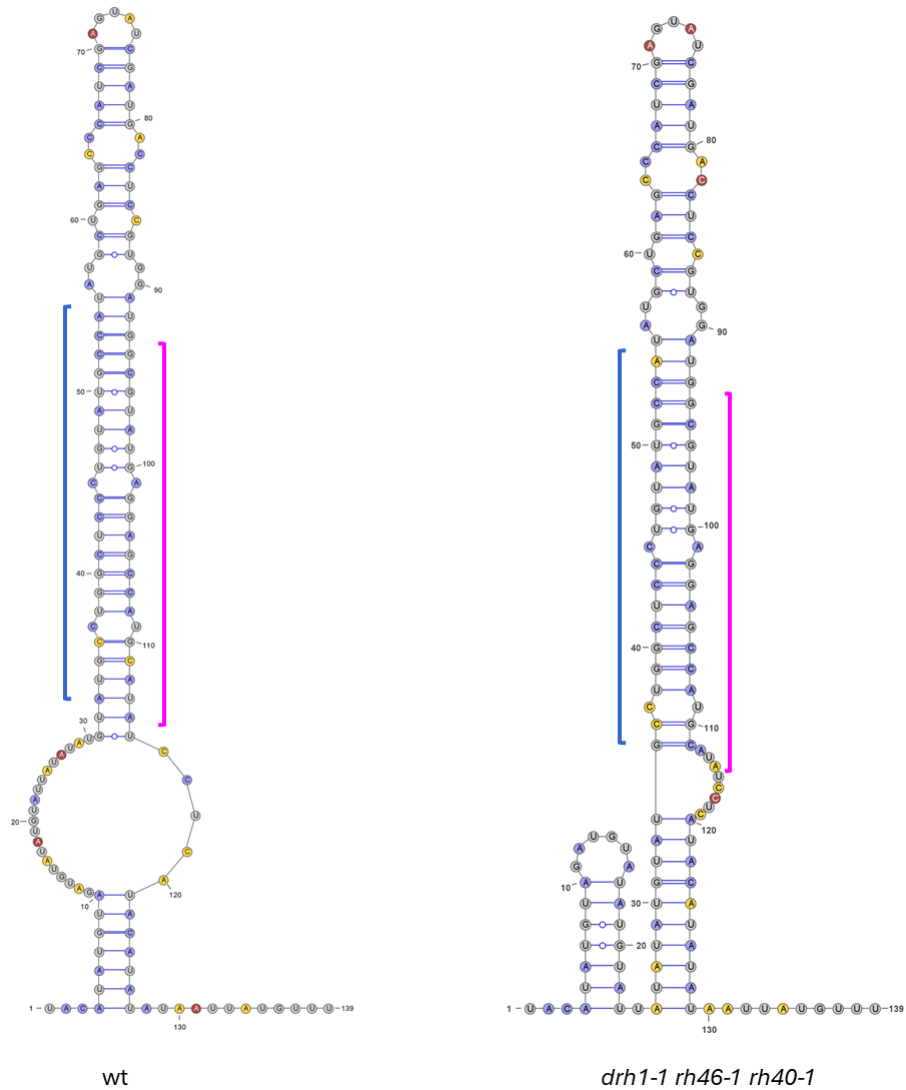
—●— wt DMS —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —●— wt kontrola —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola



Rycina 47. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA160a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.



Rycina 48. Struktura pre-miRNA160a u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanych w 22°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

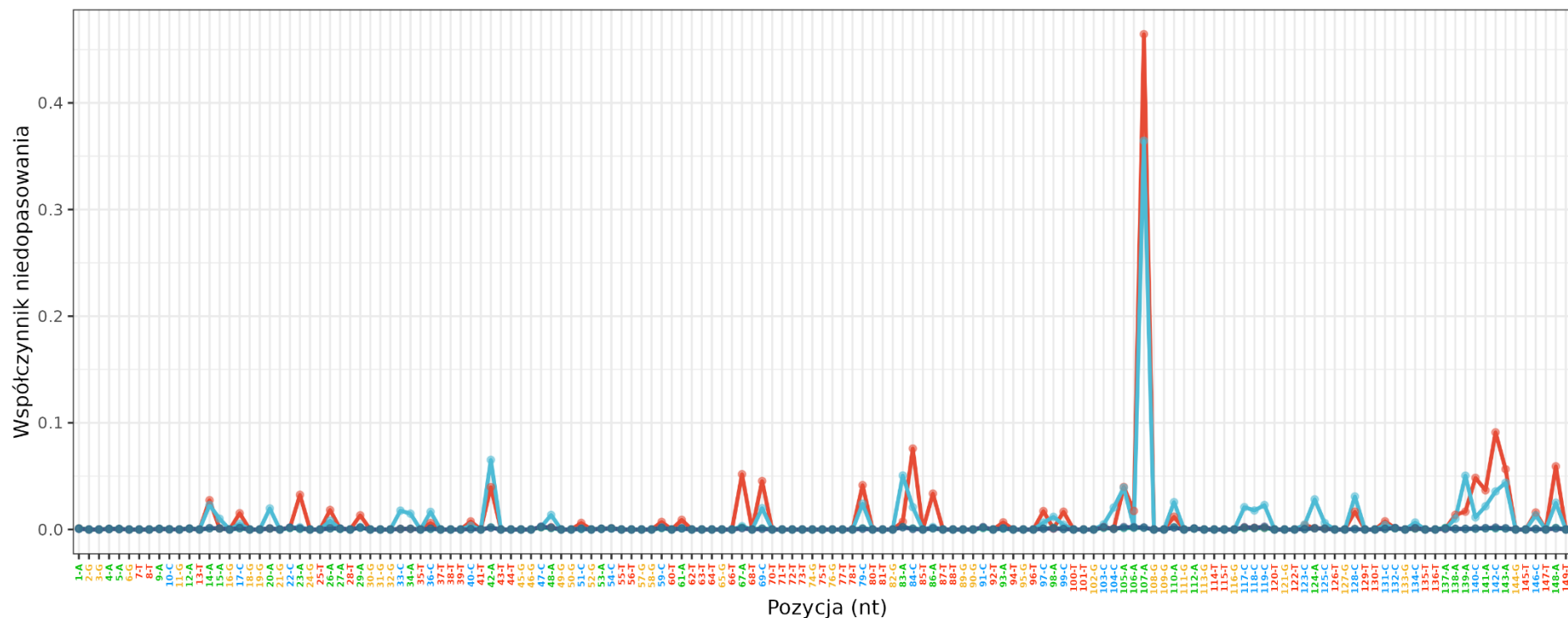


Rycina 49. Struktura pre-miRNA160a u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 16°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

Następnie przeanalizowano współczynnik niedopasowania w pre-miRNA399c u roślin typu dzikiego i mutantów *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C i 16°C. Analizy wykazały zmianę współczynnika niedopasowania w pre-miRNA399c u roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z roślinami typu dzikiego hodowanych w obu temperaturach. Przykładowo, u roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C zaobserwowano wzrost współczynnika niedopasowania we fragmencie obejmującym trzy cytozyny w pozycjach 117-119. Zmian w tych pozycjach nie zaobserwowano u roślin typu dzikiego. Oznacza to, że u mutantów *drh1-1 rh46-1 rh40-1* nukleotydy te były często modyfikowane przez DMS, sugerując, że występują one w formie jednoniciowej. U roślin typu dzikiego natomiast brak modyfikacji przez DMS oznacza, że nukleotydy te były związane z innymi komplementarnymi zasadami i występowały we fragmencie dwuniciowym (ryc. 50). Różnice zaobserwowano także dla pre-miRNA399c u mutantów *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 16°C. Zauważono, że u roślin typu dzikiego nukleotydy w pozycjach 17, 20 i 22 są wydajnie modyfikowane przez DMS, podczas gdy u mutantów *drh1-1 rh46-1 rh40-1* modyfikacje w tych miejscach nie występowały. Oznacza to, że fragment jednoniciowy w pre-miRNA399c przy braku helikaz ulega przekształceniu we fragment dwuniciowy (ryc. 51). Różnice w wartościach współczynnika niedopasowania pomiędzy roślinami typu dzikiego a roślinami *drh1-1 rh46-1 rh40-1* znalazły swoje odzwierciedlenie również w przewidywanych strukturach drugorzędowych pre-miRNA399c (ryc. 52, ryc. 53). W mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w obu warunkach temperaturowych można zauważyć zmiany w strukturze w obrębie dupleksu miRNA/miRNA* w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Ponadto, w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C zmianie uległa górna część spinki w porównaniu z roślinami typu dzikiego: duża pętla końcowa przekształciła się w dwie mniejsze pętle. Zmiany tej nie zauważono u mutantów *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C. W tym przypadku górna część struktury spinki nie uległa zmianie w porównaniu z roślinami typu dzikiego.

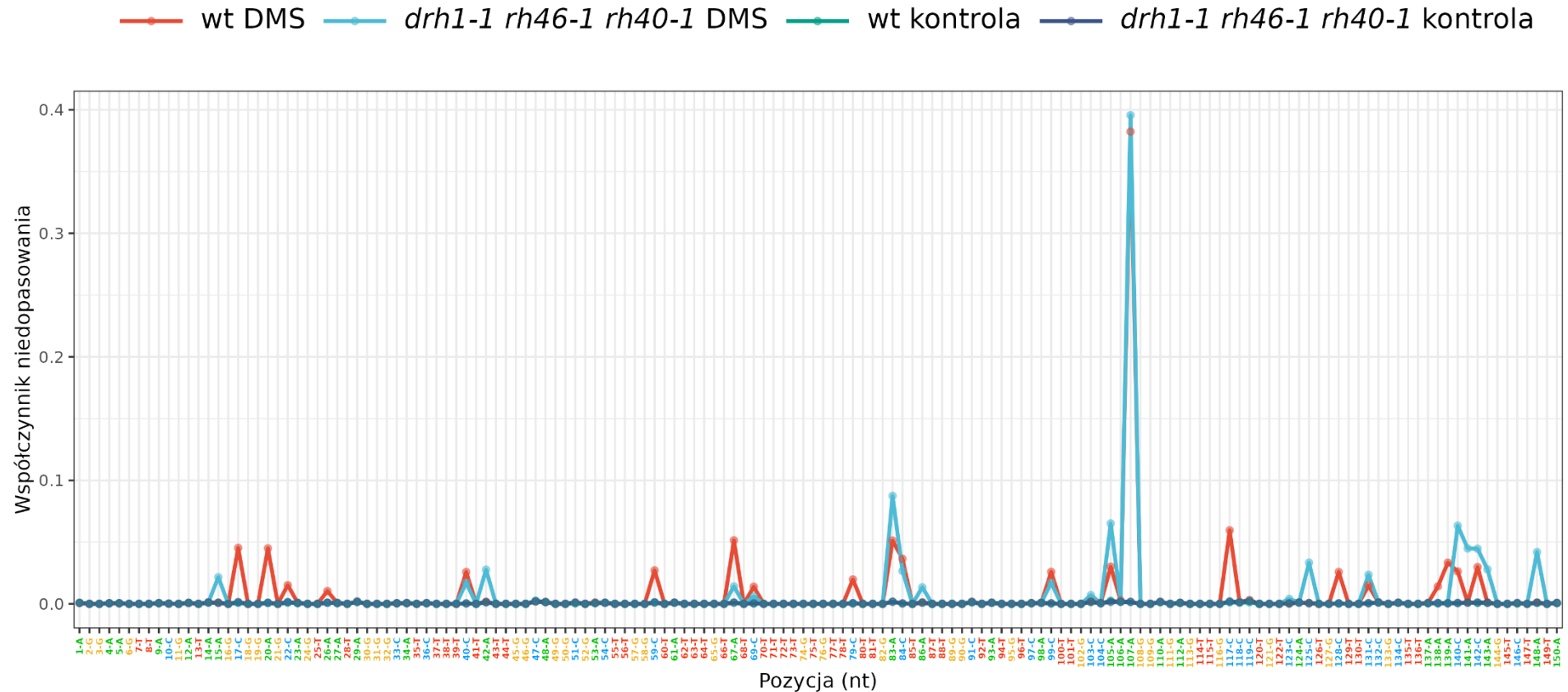
pre-miRNA399C - 22 stopnie Celsjusza

—•— wt DMS —•— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —•— wt kontrola —•— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola

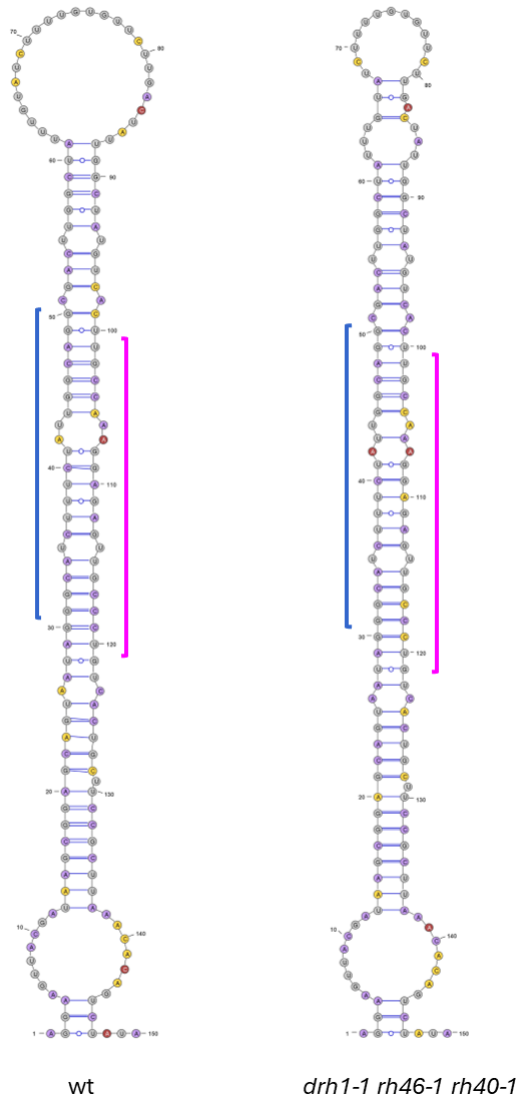


Rycina 50. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA399c w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.

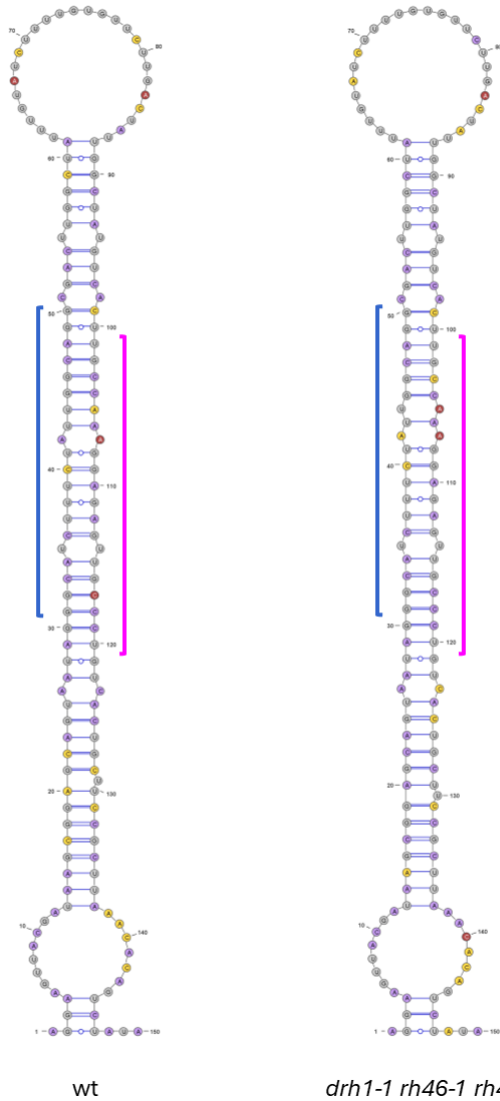
pre-miRNA399C - 16 stopni Celsjusza



Rycina 51. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA399c w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.



Rycina 52. Struktura pre-miRNA399c u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanych w 22°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

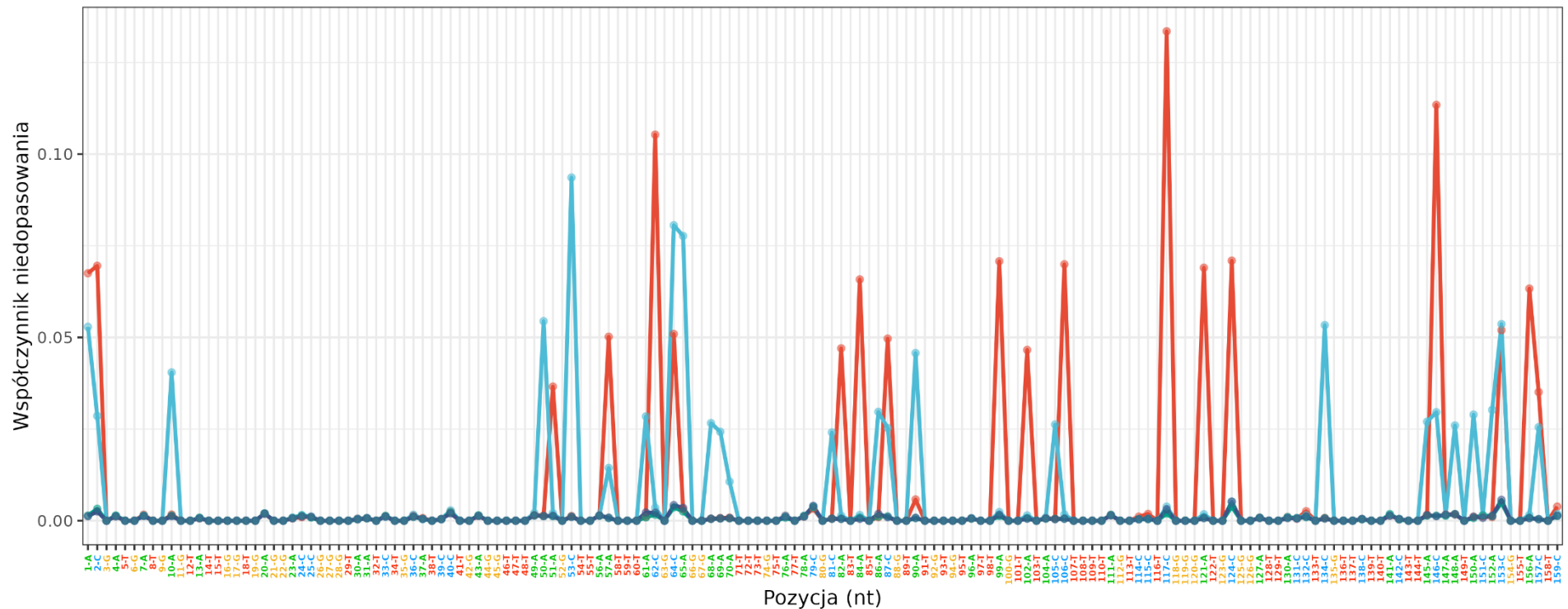


Rycina 53. Struktura pre-miRNA399c u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanych w 16°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

Przeanalizowano także współczynnik niedopasowania dla pre-miRNA2111a. Analizy wykazały występowanie dużych różnic w współczynniku niedopasowania pomiędzy mutantem *drh1-1 rh46-1 rh40-1* a rośliną typu dzikiego w obu temperaturach. Na przykład u rośliny typu dzikiego hodowanej w 22°C nukleotydy w pozycjach 117, 121 oraz 124 ulegają częstej modyfikacji przez DMS, podczas gdy u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* nukleotydy te nie są modyfikowane wcale. Odwrotną sytuację można zaobserwować dla adenin w pozycjach 68-70 oraz cytozyn w pozycjach 53 oraz 134, które ulegają modyfikacji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, ale nie w roślinie typu dzikiego (ryc. 54). Zmiany we wzorcu współczynnika niedopasowania są również znaczne u roślin hodowanych w 16°C: adeniny w pozycjach 50, 51, 56, 57, 145-148 oraz cytozyny w pozycjach 87 i 134 są silnie modyfikowane u rośliny typu dzikiego, ale nie u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (ryc. 55). Najwięcej różnic w współczynniku niedopasowania zaobserwowano w obrębie trzonu spinki: u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w obu temperaturach współczynnik niedopasowania był mniejszy niż u rośliny typu dzikiego w rejonie dupleksu miRNA/miRNA*. W rejonie poniżej dupleksu u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* odnotowano natomiast wyższy współczynnik niedopasowania niż u rośliny typu dzikiego. Przewidywane na podstawie wyników reaktywności DMS struktury drugorzędowe pre-miRNA2111a również różnią się pomiędzy rośliną typu dzikiego a mutantem *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu temperaturach. W pre-miRNA2111a zmianie ulega fragment powyżej dupleksu miRNA/miRNA*: zmienia się przede wszystkim wielkość występującej tam pętli oraz liczba i długość odchodzących od niej fragmentów dwuniciowych (ryc. 56, ryc. 57).

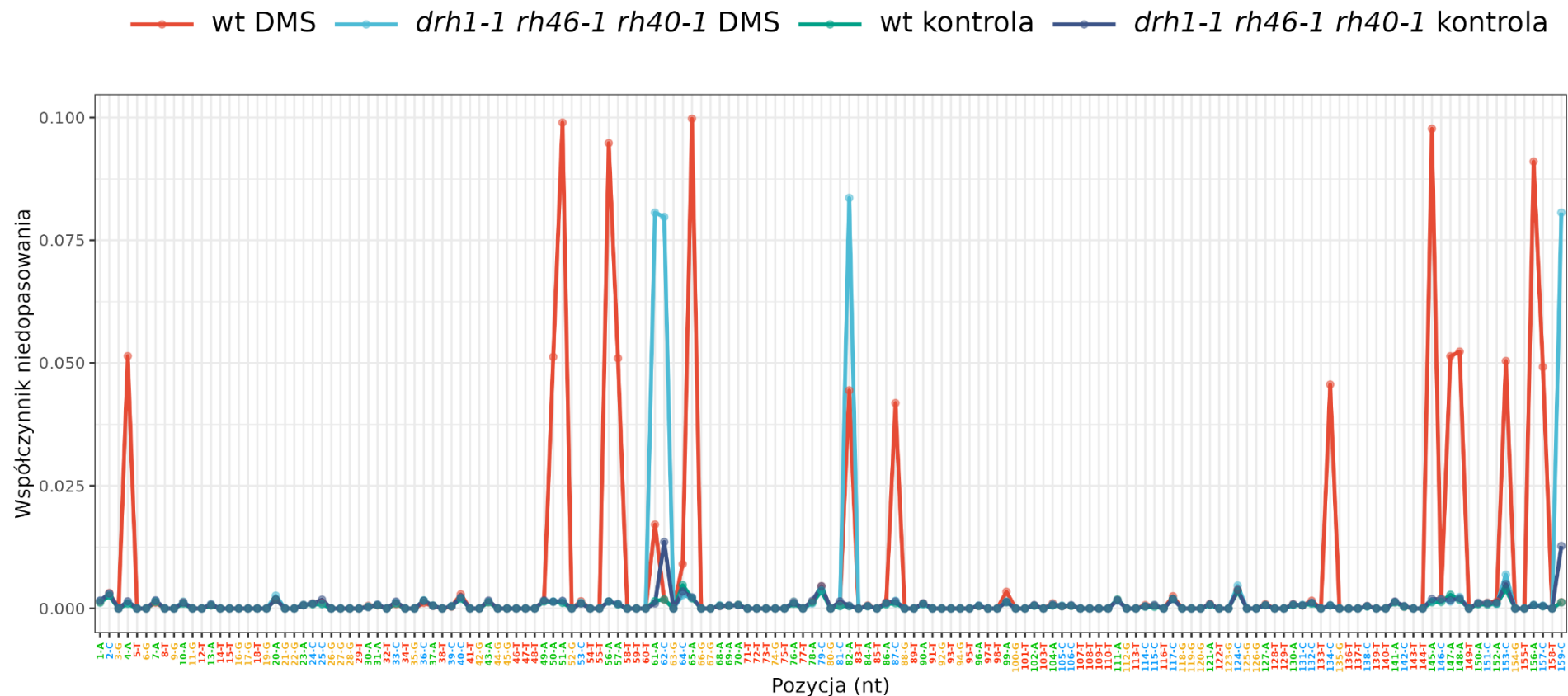
pre-miRNA2111a - 22 stopnie Celsjusza

—●— wt DMS —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —●— wt kontrola —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola

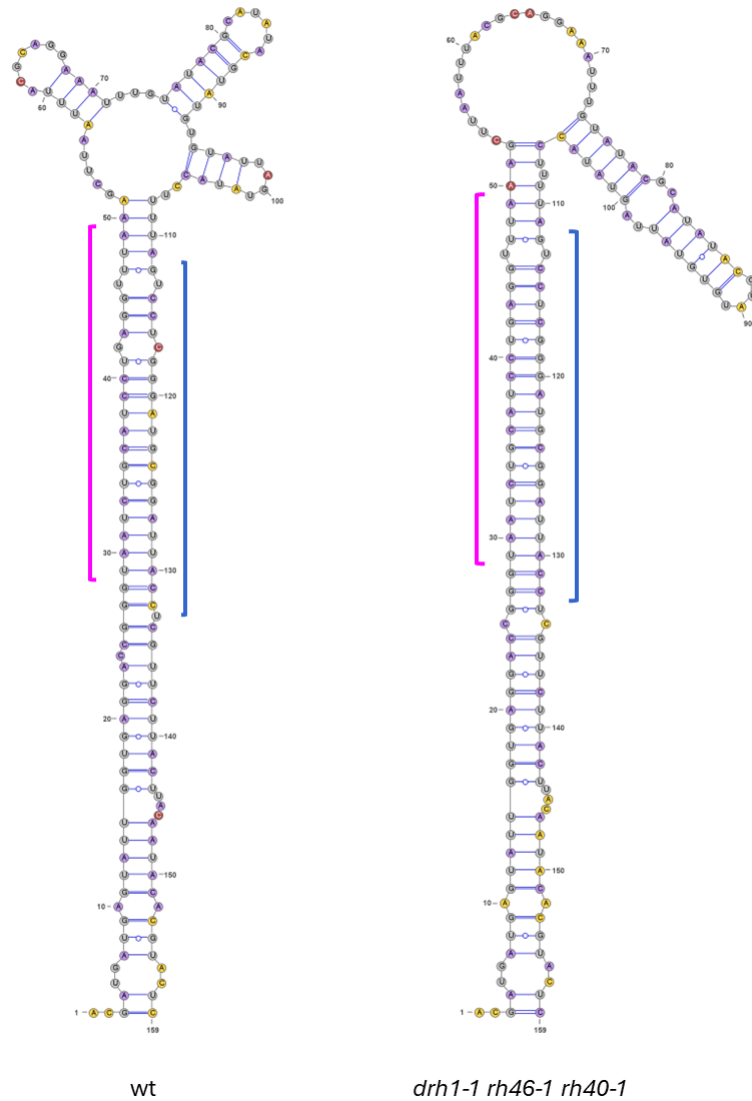


Rycina 54. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA2111a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.

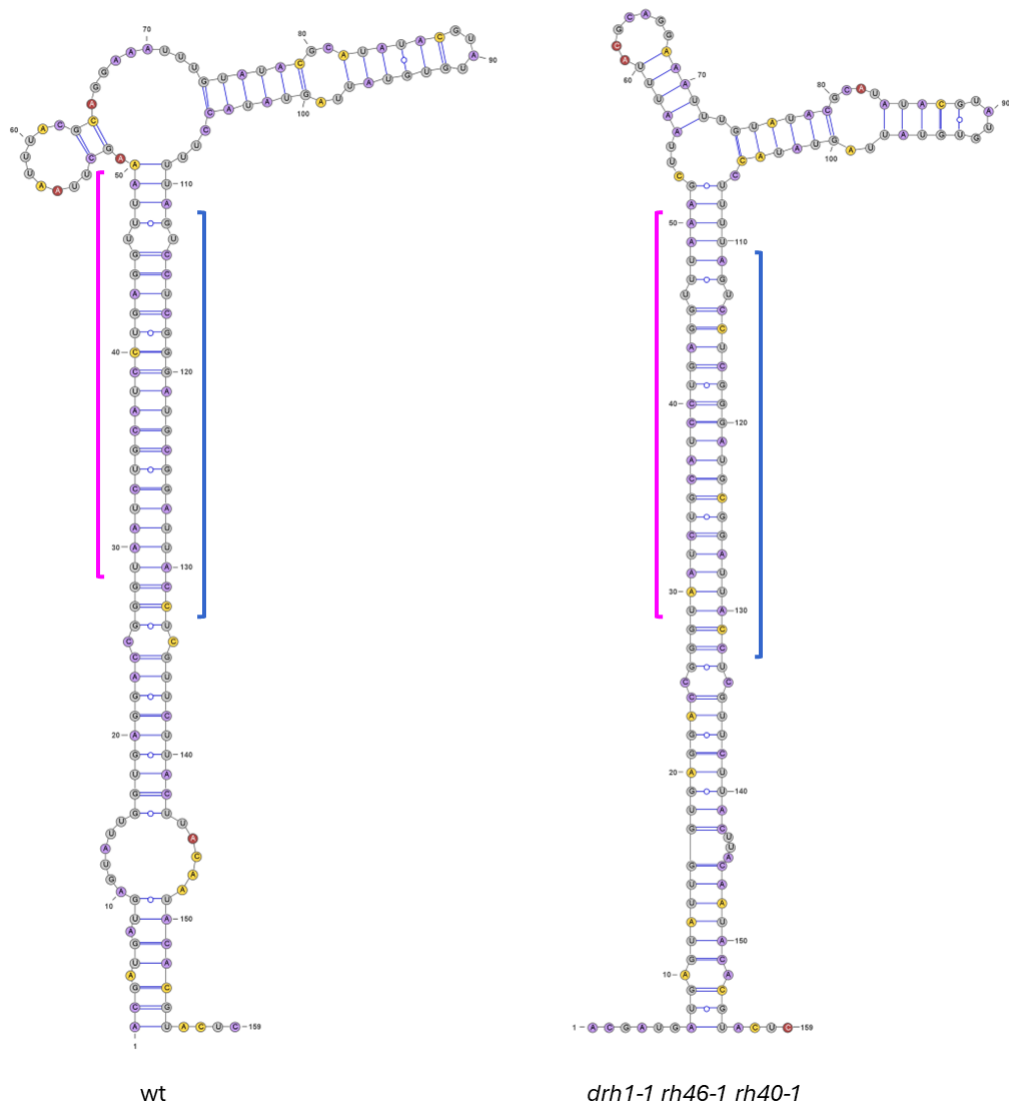
pre-miRNA2111a - 16 stopni Celsjusza



Rycina 55. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA2111a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.



Rycina 56. Struktura pre-miRNA2111a u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

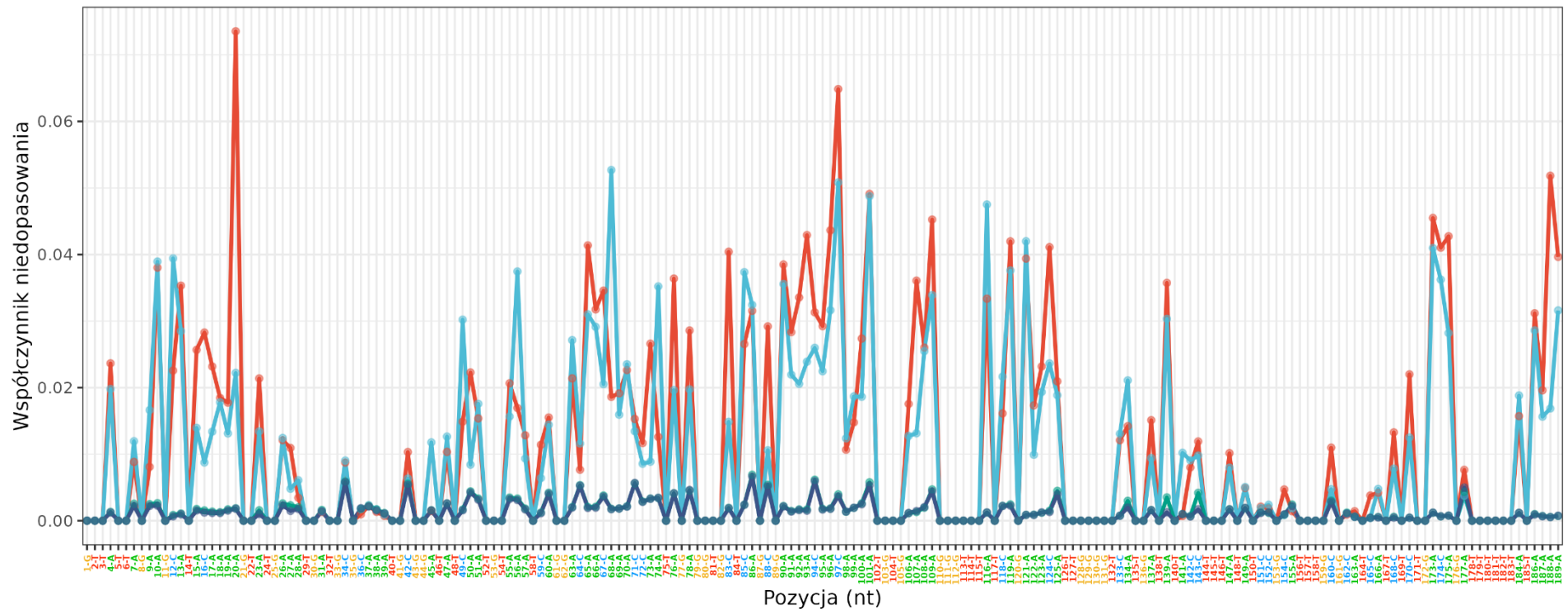


Rycina 57. Struktura pre-miRNA2111a u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanych w 16°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

Na dalszym etapie prac przeanalizowano współczynnik niedopasowania w pre-miRNA2112. Analizy te wykazały, że współczynnik niedopasowania w pre-miRNA2112 różni się pomiędzy rośliną typu dzikiego a mutantem *drh1-1 rh46-1 rh40-1* pomimo zachowania zbliżonych tendencji. Przykład stanowi adenina w pozycji 20, która u rośliny typu dzikiego jest modyfikowana kilkukrotnie częściej niż u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C (ryc. 58). Podobny wynik uzyskano dla cytozyn w pozycjach 83 i 88 oraz adeniny w pozycji 188. Adeniny w pozycjach 56 oraz 68 są natomiast częściej modyfikowane w potrójnym mutancie helikazowym niż w roślinie typu dzikiego (ryc. 58). Dodatkowo, zbliżony efekt uzyskano dla roślin hodowanych w 16°C (ryc. 59): współczynnik niedopasowania wykazuje te same tendencje u rośliny typu dzikiego i mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Ciekawymi przykładami są jednak adeniny w pozycjach 26-28, które modyfikacjom przez DMS ulegają tylko w roślinie typu dzikiego oraz adenina w pozycji 186 modyfikowana jedynie w potrójnym mutancie helikazowym. Różnice te sugerują występowanie zmian w strukturze pre-miRNA2112 spowodowane brakiem helikaz. Struktury drugorzędowe pre-miRNA2112 przewidywane na podstawie analiz reaktywności DMS wskazują na występowanie zmian w strukturze tego prekursora u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z rośliną typu dzikiego hodowanych w obu temperaturach. U mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C można zaobserwować obecność niewielkiego fragmentu dwuniciowego w obrębie pętli końcowej, który jest nieobecny u roślin typu dzikiego (ryc. 60). U mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C zauważono natomiast zwiększenie liczby niesparowanych nukleotydów w obrębie trzonu spinki do włosów w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Dodatkowo, u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C można zaobserwować odtworzenie dużej pętli końcowej obecnej w roślinie typu dzikiego hodowanej w 22°C, która u roślin typu dzikiego w 16°C ulega przekształceniu w kilka mniejszych pętli połączonych krótkim odcinkiem dwuniciowym (ryc. 61).

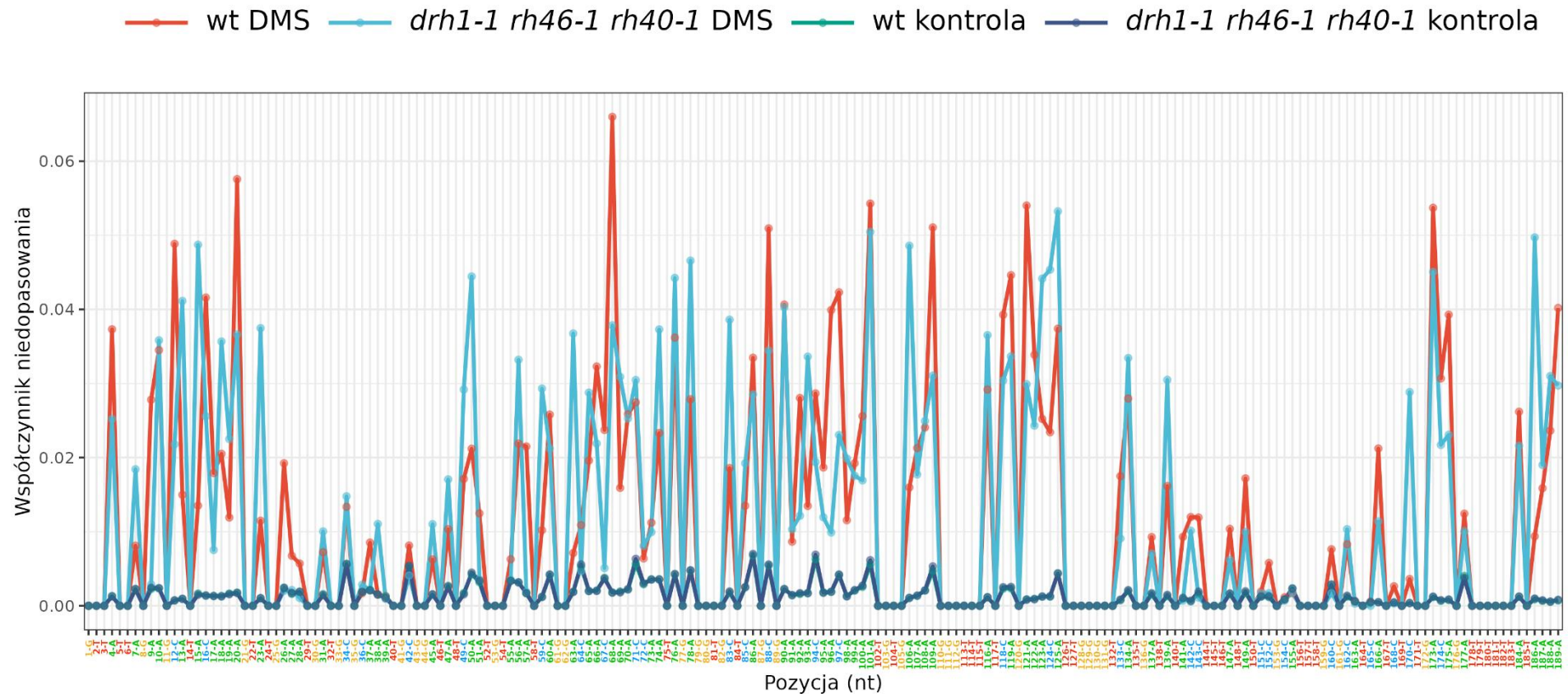
pre-miRNA2112 - 22 stopnie Celsjusza

—●— wt DMS —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 DMS —●— wt kontrola —●— drh1-1 rh46-1 rh40-1 kontrola

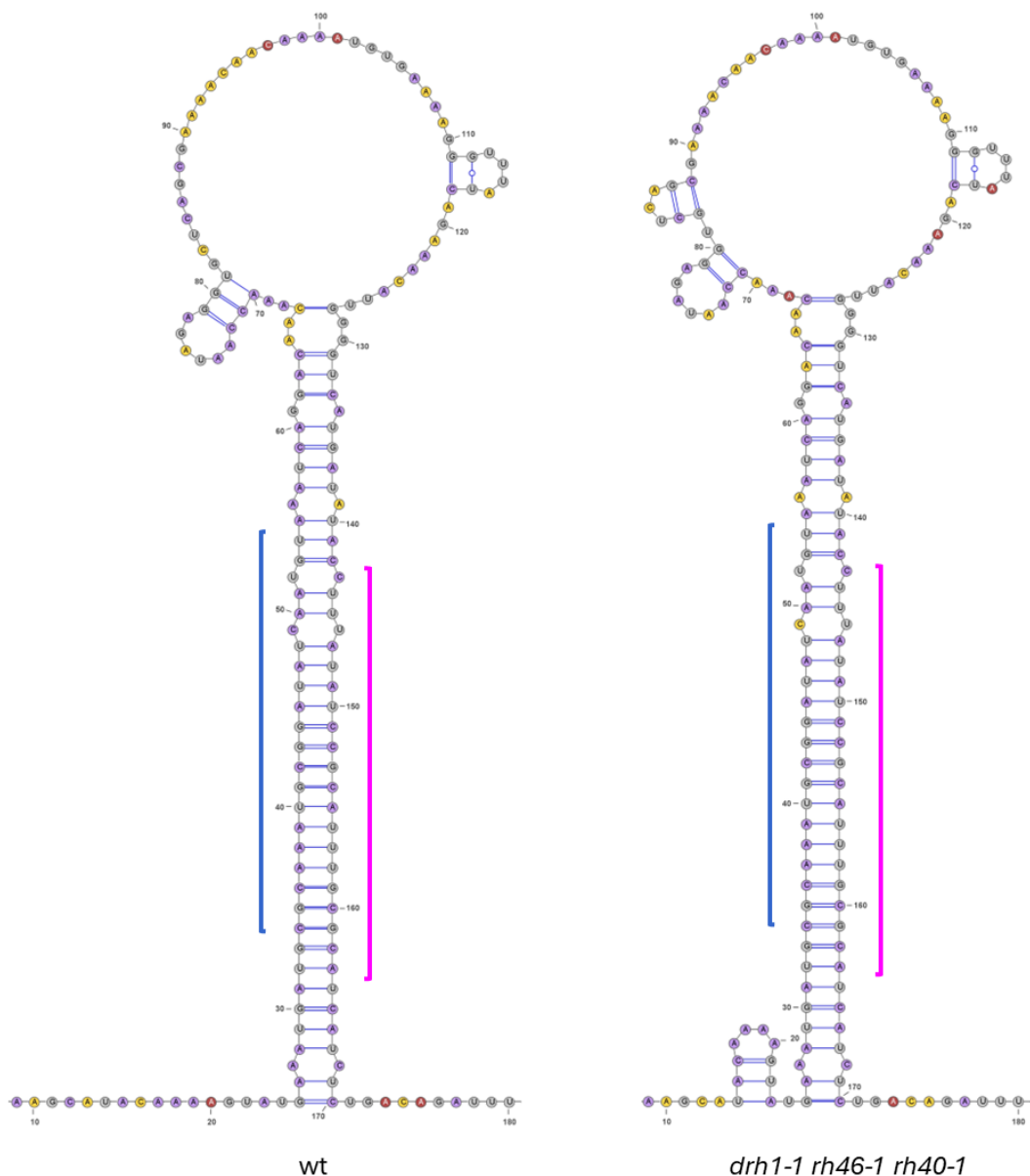


Rycina 58. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA2112 w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.

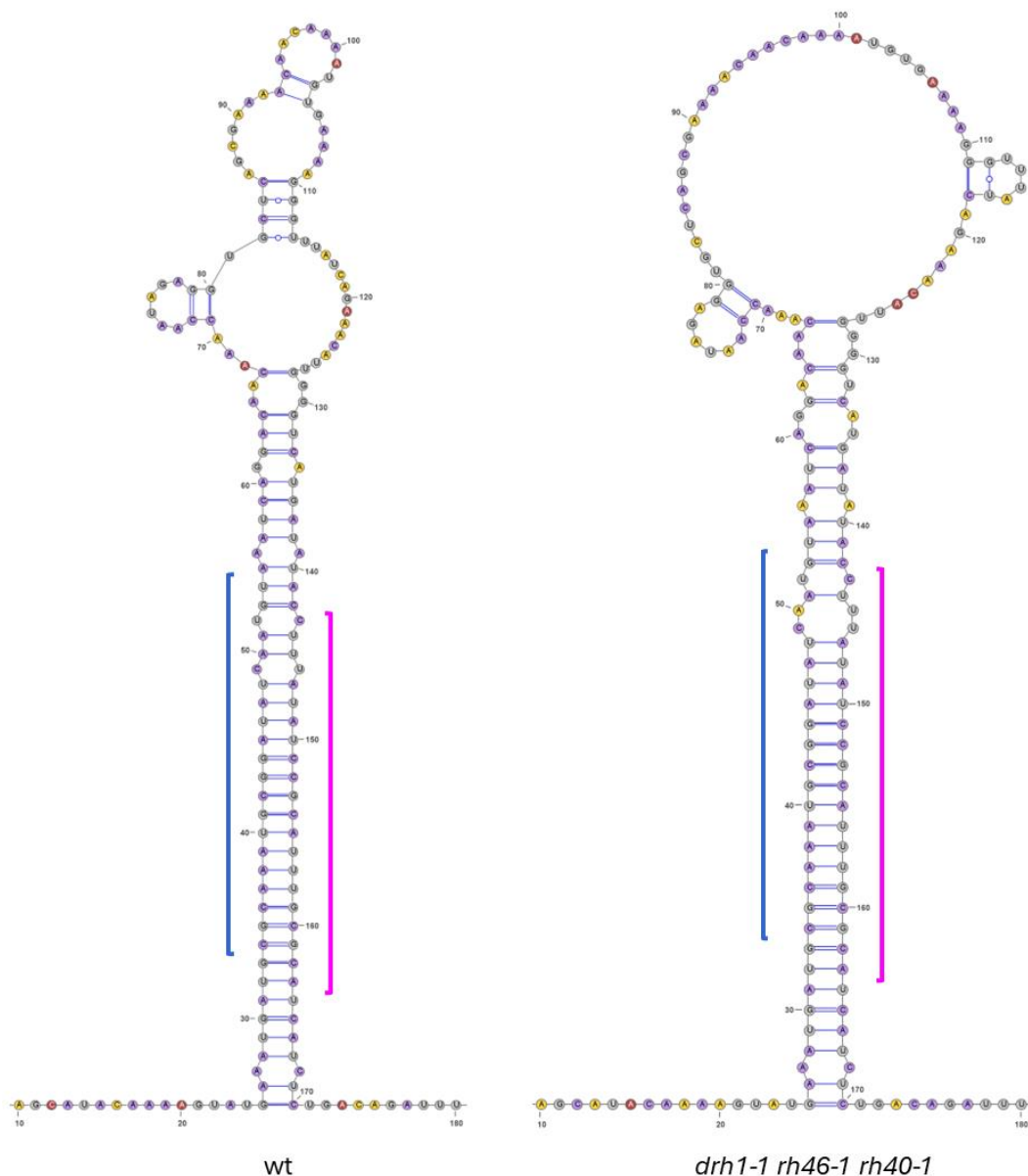
pre-miRNA2112 - 16 stopni Celsjusza



Rycina 59. Wykres przedstawiający współczynnik niedopasowania w pre-miRNA2112 w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Czerwonym kolorem oznaczono wyniki dla roślin typu dzikiego, błękitnym dla roślin *drh1-1 rh46-1 rh40-1*. Kolorem zielonym i granatowym oznaczono odpowiednio rośliny typu dzikiego i rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, które nie zostały poddane działaniu DMS.



Rycina 60. Struktura pre-miRNA2112 u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 22°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.



Rycina 61. Struktura pre-miRNA2112 u rośliny typu dzikiego (wt) oraz mutantu drh1-1 rh46-1 rh40-1 hodowanych w 16°C. Struktury modelowano na podstawie danych z reaktywności DMS. Na czerwono i żółto zaznaczono najczęściej modyfikowane przez DMS nukleotydy: na czerwono oznaczono 5% najczęściej zmienianych nukleotydów, na żółto kolejne 25% często modyfikowanych nukleotydów. Na niebiesko oznaczono pozostałe adeniny i cytozyny; na szaro guaniny i uracyle, które nie są modyfikowane przez DMS. Na różowo zaznaczono sekwencję miRNA, na niebiesko miRNA*.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy zoptymalizowano złożoną technikę celowanego DMS-MaPseq pozwalającą na zbadanie struktury drugorzędowej wyselekcjonowanych cząsteczek RNA. Podczas eksperymentu udało się pomyślnie

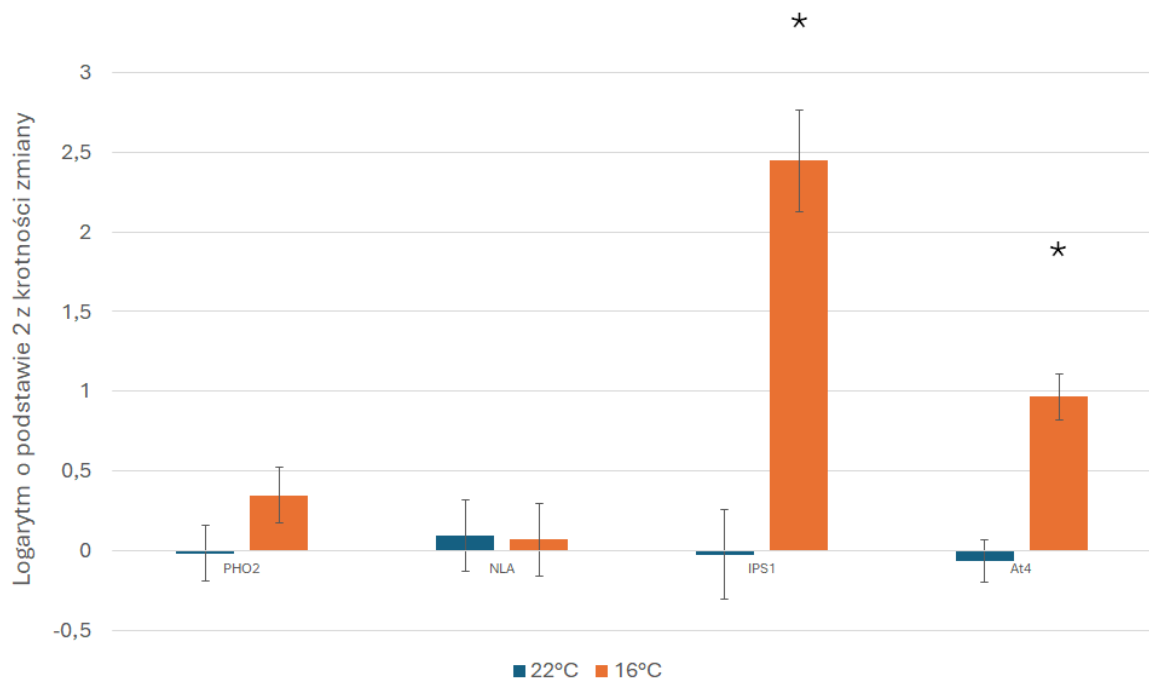
amplifikować sekwencję pięciu prekursorów. Analizy wykazały, że brak DRH1, RH46 i RH40 powoduje występowanie zmian w strukturze każdego z uzyskanych pri-miRNA. Badania nad strukturami drugorzędowymi prekursorów miRNA będą jednak dalej kontynuowane, gdyż przedstawione wyniki pochodzą z jednego tylko powtórzenia biologicznego.

5.9. Wpływ badanych helikaz na ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź rośliny na niedobór fosforanów

Podczas analizy miRNA, których poziom zmienił się istotnie w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych zaobserwowano, że znaczna część miRNA o podwyższonej akumulacji to miRNA zaangażowane w odpowiedź na stres niedoboru fosforanów. Należą do nich miR399d, miR399a, miR399f, miR2111a, miR2111b, miR399c i miR399b, których poziom, jak pokazano wcześniej, wzrasta w warunkach niedoboru fosforanów zarówno w korzeniu, jak i pędzie, oraz miR827 ulegający akumulacji tylko w pędzie. (14) Ponadto, w roślinie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wzrastają także poziomy tych miRNA, których poziom obniża się w warunkach niedoboru fosforanów. Są to: miR398b i miR398c, ulegające obniżeniu zarówno w korzeniu, jak i pędzie, miR395b, miR395c i miR395f, których poziom spada tylko w korzeniu, oraz miR398a, którego poziom obniża się tylko w pędzie (14). Przeanalizowano także poziomy prekursorów tych miRNA, które akumulują się w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* i są zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres niedoboru fosforanów. Poziomy pri-miRNA398b i pri-miRNA398c nie zmieniły się w porównaniu z rośliną typu dzikiego u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C. Jednakże u mutantu badanych helikaz hodowanego w warunkach obniżonej temperatury zaobserwowano wzrost poziomu tych prekursorów. W przypadku pri-miRNA399c, pri-miRNA399d i pri-miRNA399f odnotowano natomiast utrzymanie zbliżonych do rośliny typu dzikiego poziomów tych cząsteczek u mutantu hodowanego w obu temperaturach. Szczegółowe wyniki tych analiz przedstawiono w rozdziale 5.7.

Następnie sprawdzono poziom docelowych mRNA tych cząsteczek miRNA, które są zaangażowane w reakcję rośliny na stres niedoboru fosforanów, a ich poziom wzrósł w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Przeanalizowano zatem poziom PHO2 oraz NLA, których poziom jest kontrolowany odpowiednio przez miRNA z rodziny miRNA399 oraz miRNA827. Analizy wykazały, że poziom PHO2 i NLA nie zmieniły się w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Podwyższony poziom miRNA399 przy jednoczesnym

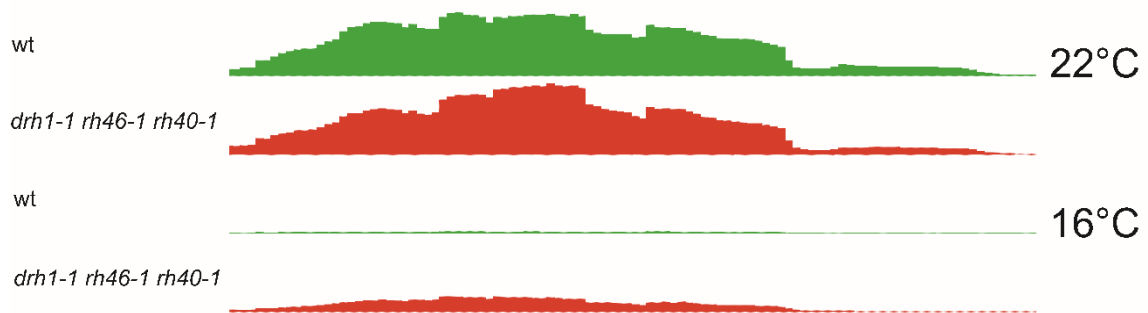
braku zmian w poziomie PHO2 zasugerował sprawdzenie poziomu IPS1 oraz At4, które są cząsteczkami wiążącymi komplementarny do nich miRNA399 i blokującymi ich aktywność (22). Poziomy obu tych transkryptów nie uległy zmianie w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. W roślinach *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 16°C, poziomy IPS1 i At4 były natomiast istotnie statystycznie podwyższone w porównaniu z rośliną typu dzikiego (ryc. 62).



Rycina 62. Poziomy PHO2, NLA, IPS1 i At4 w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C oraz 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Kolorem niebieskim zaznaczono *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C, kolorem pomarańczowym zaznaczono *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C. Na osi y zaznaczono logarytm o podstawie 2, opisujący krotność zmian względem próby kontrolnej. Gwiazdką zaznaczono zmiany istotne statystycznie. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Podczas analizy liczby odczytów dla IPS1 oraz At4 w roślinach typu dzikiego i potrójnych mutantów helikazowych zauważono jednak, że ekspresja IPS1 oraz At4 u rośliny typu dzikiego hodowanej w 16°C jest bardzo niska. Obniżenie poziomów IPS1 i At4 było także zauważalne u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C, jednak liczba transkryptów w tych roślinach była wyższa niż u roślin typu dzikiego (ryc. 63, ryc. 64). Poskutkowało to błędną interpretacją uzyskanego wyniku, sugerującą na znaczy wzrost ekspresji IPS1 i At4 w potrójnym mutancie helikazowym. Liczba odczytów dla IPS1 i At4 w roślinach *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanych w 16°C była jednak dużo niższa niż u roślin

typu dzikiego i potrójnych mutantów helikazowych hodowanych w standardowych warunkach hodowli (22°C).



Rycina 63. Profil odpowiadający odczytom w rejonie genu *AT3G09922* kodującego *IPS1* (na podstawie przeglądarki genomowej *IGV*). Profile transkrypcji przygotowane w przeglądarce *IGV*, z wykorzystaniem normalizowanych odczytów sekwencjonowania RPM rośliny typu dzikiego (zielony profil ekspresji) i potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (czerwony profil ekspresji) hodowanych w 22°C i 16°C.



Rycina 64. Profil odpowiadający odczytom w rejonie genu *AT5G03545* kodującego *At4* (na podstawie przeglądarki genomowej *IGV*). Profile transkrypcji przygotowane w przeglądarce *IGV*, z wykorzystaniem normalizowanych odczytów sekwencjonowania RPM rośliny typu dzikiego (zielony profil ekspresji) i potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* (czerwony profil ekspresji) hodowanych w 22°C i 16°C.

Zebrane wyniki pokazują, że brak DRH1, RH46 i RH40 powoduje akumulację miRNA zaangażowanych w reakcję rośliny na niedobór fosforanów. Jednocześnie nie zaobserwowano zmian w poziomach docelowych mRNA tych miRNA. Zmianie nie ulega także poziom *IPS1* oraz *At4*, które wiążą cząsteczki z rodziny miRNA399, będącej najbardziej wrażliwą na niedobory fosforanów rodziną miRNA.

6. Dyskusja

6.1. DRH1 jest zasocjowane z czynnikami zaangażowanymi w biogenezę miRNA

W celu lepszego zrozumienia roli helikazy DRH1 wykonano analizę białek oddziałujących z tą helikazą. Za pomocą przeciwciał anti-GFP wytrącono z ekstraktu białkowego białko fuzyjne GFP-DRH1, a następnie zidentyfikowano białka, które się z DRH1 wytrąciły. Do tej pory interaktom helikazy DRH1 nie był scharakteryzowany. Wcześniej pokazano, że DRH1 oddziałuje z białkiem NUP107 stanowiącym część nukleopora NUP107-160 (93) oraz białkiem UPF1 zaangażowanym w degradację RNA w szlaku NMD (94). W niniejszej pracy zbadano interaktom helikazy DRH1 i przeanalizowano oddziaływania z wybranymi białkami.

Analizy wykazały, że helikaza DRH1 występuje w kompleksach z białkami zaangażowanymi w biogenezę miRNA: CPL1, CDC5, GRP7, HESO1, SE oraz AGO1. Każde z tych białek jest zaangażowane w obróbkę miRNA na różnym jej etapie. CPL1 jest fosfatazą defosforylującą seryny zlokalizowane w domenach wiążących dsRNA białka HYL1. Defosforylacja HYL1 jest niezbędna dla jego prawidłowego działania w biogenezie miRNA. CPL1 nie oddziałuje bezpośrednio z HYL1, a kontaktuje się z nim poprzez białko SE, które stanowi platformę dla przejściowej interakcji CPL1-HYL1 (98). Dodatkowo, CPL1 defosforyluje również serynę 5 w domenie CTD RNAPII (97), przez co wpływa na przebieg transkrypcji przeprowadzanej przez RNAPII, a także moduluje procesy związane z obróbką pre-mRNA (97). Asocjacja DRH1 z CPL1 i bezpośrednie oddziaływanie z SE sugeruje, że DRH1 jest obecne w trakcie defosforylacji HYL1, czyli jest związane z Mikroprocesorem od samego początku jego formowania. Dodatkowo, jak pokazano w tej rozprawie doktorskiej, DRH1 oddziałuje bezpośrednio z domeną CTD RNAPII. Wspólnie z DRH1 współwytrąca się także białko CDC5, które oddziałuje z RNAPII oraz promotorami genów *MIR* i reguluje wiązanie rejonów promotorowych przez RNAPII (99). Zebrane wyniki wskazują, że DRH1 może być związane z RNAPII już od wczesnych etapów transkrypcji i towarzyszy jej podczas elongacji i terminacji, niezależnie od stopnia fosforylacji domeny CTD RNAPII. Hipotezę tę wspiera fakt, że wśród białek współocyszczonych z DRH1 zidentyfikowano także białko NRPB2, które jest drugą największą podjednostką RNAPII.

Uzyskane wyniki wskazują, że helikaza DRH1 może być także aktywna na etapie potranskrypcyjnym, gdyż kolejnym współocyszczonym z helikazą DRH1 czynnikiem

zaangażowanym w biogenezę miRNA jest białko GRP7. GRP7 wpływa na obróbkę prekursorów miRNA poprzez zaangażowanie w splicing pri-miRNA (100). Ponadto, bierze udział w splicingu alternatywnym mRNA (106). Obserwacja DRH1 z GRP7 pozwala na wysnuć przypuszczenia, że helikaza DRH1 jest zaangażowana nie tylko w splicing pri-miRNA, ale także mRNA, jako że wśród współwytrąconych z DRH1 białek zidentyfikowano również takie, które są powiązane funkcjonalnie ze splicingiem mRNA (m.in. BRR2A PRP8A, U1-70K). Ponadto, taką hipotezę może potwierdzać obserwacja, że w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* odnotowano kilkadziesiąt zmian splicingowych w pre-mRNA. Wśród białek współwytrąconych z DRH1 jest także HESO1 będące 3' terminalną transferazą urydylową. Białko to dodaje nukleotydy urydylowe do niemetylowanych 3' końców miRNA, co destabilizuje te cząsteczki i prowadzi do ich degradacji (101, 102). HESO1 działa już więc na etapie, gdy prekursor uległ całkowitej obróbce, a dupleks miRNA/miRNA* został uwolniony. Asocjacja DRH1 z HESO1 sugeruje, że helikaza ta odgrywa rolę również i na tym etapie życia cząsteczki RNA, będąc obecną podczas procesu wyznaczania miRNA do degradacji.

6.2. DRH1 oddziałuje z SERRATE

W niniejszej pracy pokazano, że helikaza DRH1 oddziałuje bezpośrednio z białkiem SE. SE jest dużym białkiem (81 kDa) o złożonej architekturze (zawiera trzy wysoce ustrukturyzowane domeny oraz dwa nieustrukturyzowane rejony, N- i C-końcowy) (40). Taka budowa umożliwia SE oddziaływanie z różnorodnymi białkami zaangażowanymi w metabolizm RNA (51). Do tej pory zidentyfikowano ponad 50 różnych białek bezpośrednio oddziałujących z SE (45). Wiele z tych interaktorów zaangażowanych jest w transkrypcję, splicing, poliadenylację czy biogenezę miRNA, sugerując, że SE może koordynować obróbkę transkryptów RNAPII. Ponadto, SE oddziałuje z czynnikami zaangażowanymi w degradację RNA: 5' egzonukleazami XRN oraz podjednostkami kompleksu NEXT (51, 107, 108). Wynik ten świadczy o tym, że SE może decydować o losie cząsteczki RNA i kierować ją do degradacji, bądź dalszej obróbki. Uzyskane w ramach mojej pracy wyniki wskazują, że DRH1 również jest zasocjowane z dużą liczbą białek, w tym z XRN2/3 oraz ZCCHC8A i RBM7, czyli podjednostkami kompleksu NEXT. Wynik ten wskazuje, że DRH1 pełni rolę w degradacji RNA, w tym również pri-miRNA. Możliwym jest także, że te powiązania nie wynikają z bezpośredniego oddziaływania tych białek z DRH1, a z oddziaływania z SE, z którym DRH1 oddziałuje bezpośrednio. W takim przypadku to SE stanowić może platformę prowadzącą kolejne kompleksy białkowe do transkryptu związanego przez DRH1. SE

wiąże geny *MIR* oraz oddziałuje z RNAPII (poprzez białko wspomagające U1 snRNP PRP40a/b (PRE-MRNA PROCESSING PROTEIN 40a/b)) (109), a także z białkami CPL1 (98), CDC5 (99), NOT2a/b (110) i Elongatorem (111). Prawdopodobnym jest zatem, że to SE sprowadza DRH1 do genów *MIR*, umożliwiając DRH1 związaną domenę CTD RNAPII. Co więcej, samo DRH1, podobnie jak inne helikazy z rodziny DEAD-box, nie wykazuje specyficzności sekwencji. Możliwym jest, że wpływ na wybór cząsteczki RNA, która zostanie związana przez DRH1 ma bezpośrednio białko SE lub któreś z licznych białek oddziałujących z DRH1.

Asocjacja helikazy DRH1 z białkami zaangażowanymi w różne etapy biogenezy miRNA oraz bezpośrednie oddziaływanie z białkiem SE, które stanowi kluczowy czynnik koordynujący przebieg procesów związanych z dojrzewaniem RNA, świadczy o tym, że helikaza DRH1 jest związana z prekursorem od samego początku jego powstania. Poprzez oddziaływanie z domeną CTD RNAPII oraz asocjację z NRPB2, DRH1 może wpływać na strukturę nawet niewielkich fragmentów świeżo powstałego transkrypty i działać jeszcze w czasie trwania transkrypcji, powodując w ten sposób powstanie struktur wpływających na przebieg kolejnych etapów dojrzewania RNA. Asocjacja z białkami stanowiącymi podjednostki kompleksów zaangażowanych w każdy etap przetwarzania RNA nasuwa myśl, że DRH1 może być przekazywany kolejnym kompleksom, które są ściśle związane z RNA. Dzięki temu DRH1 pozostaje blisko dojrzewającego transkrypty i może wpływać na jego strukturę w różnych fragmentach i na każdym etapie jego obróbki.

6.3. DRH1 oddziałuje z ARGONAUTE1

W niniejszej pracy wykazano także, że DRH1 bezpośrednio oddziałuje z białkiem AGO1: w eksperymencie koimmunoprecypitacji, AGO1 stanowiło jedno z najczęściej współocyszczanych z DRH1 białek, a analiza FRET-FLIM potwierdziła bezpośredniość tego oddziaływania. AGO1 jest zaangażowane w proces potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów. Wspólnie z miRNA tworzy indukowany przez RNA kompleks wyciszający (ang. *RNA-induced silencing complex*, RISC), który wyszukuje komplementarne do miRNA cząsteczki mRNA i przeprowadza ich cięcie lub hamuje transkrypcję (31). Pokazano, że ludzki homolog helikazy DRH1, białko DDX5, rozplata dupleks miRNA/miRNA* let-7 i ułatwia ładowanie dojrzalej cząsteczki na AGO2 (85). Dodatkowo pokazano, że akumulacja miRNA spowodowana obniżonym poziomem DDX5, nie prowadzi do obniżenia poziomów ich transkryptów docelowych. Wynik ten sugeruje, że DDX5 jest niezbędne dla prawidłowego działania RISC (112). Możliwe jest, że DRH1 u *Arabidopsis* pełni podobną

rolę do ludzkiego DDX5. Asocjacja z białkami zaangażowanymi w różne etapy metabolizmu RNA oraz SE sugerują, że DRH1 towarzyszy prekursorowi podczas obróbki, aż do uwolnienia dupleksu miRNA/miRNA*. Następnie DRH1 może, podobnie jak DDX5, rozplatać dupleks i przekazywać dojrzałą cząsteczkę miRNA na AGO1, pomagając tym samym w uformowaniu kompleksu RISC. Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza transkryptomu mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji (Illumina) wykazała, że poziomy wielu docelowych mRNA rozpoznawanych przez miRNA, których poziom wzrósł, nie ulegają obniżeniu. Może to świadczyć o niewydajnym ładowaniu tych miRNA na AGO1 i nieformowaniu aktywnego kompleksu RISC spowodowanym brakiem helikaz DRH1, RH46 i RH40. Ta interesująca hipoteza wymaga jednak dalszych badań.

W 2018 roku, Bologna i współpracownicy pokazali, że miRNA są transportowane do cytoplazmy w kompleksie z białkiem AGO1. Związanie przez AGO1 metylovanego miRNA powoduje zmianę konformacji tego białka, a w konsekwencji odsłonięcie sygnału eksportu z jądra komórkowego (ang. *nuclear export signal*, NES), rozpoznawanego przez wysoce zakonserwowane białko CRM1/EXPORTIN1, które umożliwia eksport kompleksu AGO1:miRNA z jądra do cytoplazmy (32). DRH1 oddziałuje bezpośrednio z komponentami kompleksu nukleopora NUP107-160. Ponadto, u mutantu *drh1-1* zaobserwowano akumulację mRNA w jądrze komórkowym (93). Dane te wskazują, że DRH1 bierze udział w transporcie cząsteczek RNA z jądra do cytoplazmy. Możliwym jest zatem, że DRH1 jest zaangażowane także w eksport kompleksu AGO1:miRNA poprzez oddziaływanie z AGO1 i białkami budującymi nukleopory.

6.4. Wpływ helikaz DRH1, RH46 i RH40 na biogenezę miRNA

W celu zbadania wpływu helikaz DRH1, RH46 i RH40 na biogenezę miRNA przeprowadzono sekwencjonowanie NGS małych RNA. Do analiz użyto rośliny typu dzikiego oraz mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowane w 22°C oraz 16°C. Analizy wykazały zmianę w poziomie 41 miRNA u mutantów hodowanych w 22°C oraz zmianę w poziomie 69 miRNA u mutantów hodowanych w 16°C. Wynik ten wskazuje, że DRH1, RH46 i RH40 są wcześniej nieopisanymi regulatorami biogenezy części miRNA. Wzrost liczby miRNA o zmienionym poziomie u mutantów hodowanych w 16°C w porównaniu z tymi hodowanymi w 22°C sugeruje z kolei wzmocnienie efektu braku helikaz w obniżonej temperaturze. Co ciekawe, obniżenie temperatury spowodowało znaczny wzrost liczby miRNA, które w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* są akumulowane: u mutantów hodowanych

w 16°C było ich 43, podczas gdy u roślin hodowanych w 22°C było ich o 20 mniej. U mutantów hodowanych w 16°C liczba miRNA, których poziom uległ obniżeniu (26 miRNA) wzrosła tylko o osiem miRNA w porównaniu z mutantami hodowanymi w 22°C (18 miRNA). Wynik ten jest niezwykle interesujący, jeśli wziąć pod uwagę reakcje mutantów czynników biorących udział w pierwszych etapach biogenezy miRNA (SE, HYL1) na obniżoną temperaturę: u *se-3* i *hyl1-2* następuje przywrócenie poziomów dojrzałych miRNA do poziomów porównywalnych do roślin typu dzikiego. Natomiast u mutantów czynników działających w późniejszych etapach biogenezy miRNA po uzyskaniu dupletu miRNA/miRNA* (*ago1-25*, *hen1-5*) poziomy miRNA w niższej temperaturze nie ulegają zmianie (113). Dane te sugerują występowanie odrębnego mechanizmu działania DRH1, RH46 i RH40 na przebieg biogenezy miRNA.

Analizy poziomów prekursorów wybranych miRNA (pri-miR399c, pri-miR399d, pri-miR399f) wykazały brak zmian w ich poziomach w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu warunkach temperaturowych pomimo wzrostu poziomów dojrzałych miRNA w tych roślinach. Wskazuje to na wpływ DRH1, RH46 i RH40 na biogenezę tych miRNA na etapie potranskrypcyjnym. Fakt, że podobny efekt zaobserwowano u kilku członków tej samej rodziny miRNA świadczy o występowaniu wspólnego mechanizmu regulacji ekspresji tych miRNA przez DRH1, RH46 i RH40. Zupełnie inny wynik otrzymano dla prekursorów z rodziny miRNA398: u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C zaobserwowano podwyższenie poziomów pri-miRNA398b i pri-miRNA398c. Poziom dojrzałego miRNA398b był podwyższony u rośliny *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanej w 22°C i 16°C, ale w sposób nieistotny statystycznie. Podobny wynik otrzymano dla miRNA398c u potrójnego mutantu helikazowego hodowanego w standardowych warunkach. Jednakże poziom tej cząsteczki był statystycznie istotnie podwyższony u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C. Jednocześnie poziom pri-miRNA398b i pri-miRNA398c jest podwyższony u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w obu warunkach temperaturowych, co wskazuje na zaangażowanie badanych helikaz w transkrypcję miRNA z rodziny miRNA398. Podsumowując, zebrane dotychczas dane sugerują, że DRH, RH46 i RH40 są negatywnymi regulatorami biogenezy części miRNA, a mechanizm ich działania jest odmienny dla różnych rodzin miRNA. W Zakładzie Ekspresji Genów badania nad mechanizmem działania DRH1, RH46 i RH40 w czasie dojrzewania miRNA będą kontynuowane.

6.5. Wpływ helikaz DRH1, RH46 i RH40 na transkryptom

Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie nowej generacji transkryptomu wykazało, że brak helikaz DRH1, RH46 i RH40 powoduje zmianę ekspresji 2877 genów u roślin hodowanych w 22°C oraz 3782 genów u roślin hodowanych w 16°C. Poziom ekspresji niemal połowy z tych genów był obniżony, a drugiej podwyższony w potrójnym mutancie helikazowym w obu temperaturach. Zmiany w poziomie ekspresji genów w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* sugerują wpływ badanych helikaz na poziom transkryptów na dwa sposoby: (i) DRH1, RH46 i RH40 mogą bezpośrednio regulować transkrypcję tych genów lub (ii) działać na strukturę powstającego transkryptu wpływając w ten sposób na przebieg kolejnych etapów ich obróbki. Na podstawie obecnie posiadanych danych trudno ocenić, na którym z etapów metabolizmu RNA badane helikazy są aktywne. Ponadto, 959 genów o zmienionej ekspresji jest wspólnych dla obu warunków temperaturowych. Wynik ten sugeruje, że badane helikazy wpływają na ekspresję tych genów niezależnie od temperatury otoczenia. W przypadku pozostałych genów o zmienionej ekspresji, zaobserwowano, że ich poziom zmienia się tylko w jednym z zastosowanych warunków temperaturowych. Wiadomym jest, że zależnie od temperatury otoczenia, RNA może przyjmować inną strukturę drugorzędową. Możliwym jest zatem, że wpływ helikaz na ekspresję niektórych genów jest zależny od przyjętej przez powstały transkrypt struktury, którą badana helikaza może lub też nie rozpleść. By zbadać te przypuszczenia przeprowadzono eksperyment DMS-MaPseq dla całego transkryptomu. Biblioteki RNA zostały już przygotowane. Analiza wyników wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji, która zostanie przeprowadzona wkrótce, wykaże czy w strukturze transkryptów o zmienionym poziomie ekspresji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* występują zmiany.

Dane uzyskane z sekwencjonowania nowej generacji zostały wykorzystane także do analizy splicingu. Badanie tego procesu wykazało niewielki wpływ DRH1, RH46 i RH40 na przebieg składania genu. Wykryto występowanie zmian splicingowych w 55 mRNA u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C oraz 62 mRNA u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Najczęściej pojawiającym się zdarzeniem splicingowym u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* jest zatrzymanie intronów. Możliwe, że badane helikazy powodują przyjęcie przez transkrypt odpowiedniej struktury umożliwiającej wycięcie intronu. Należy jednak pamiętać, że mała liczba odnotowanych zmian w splicingu może wynikać z szybkiej degradacji niepoprawnie złożonych transkryptów. W celu wykluczenia takiej możliwości należałoby przeprowadzić

analizę splicingu przy zahamowanym działaniu maszynerii degradacyjnej, na przykład poprzez przygotowanie mutantu, w którym oprócz helikaz nie powstaje także białko HEN2, będące częścią kompleksu NEXT. Ponadto, jak pokazały wyniki koimmunoprecypitacji, DRH1 jest zasocjowane z białkami zaangażowanymi w splicing. Spośród kilku z tych białek najciekawszymi wydają się BRR2A oraz PRP8. Oba białka są kluczowe dla prawidłowego przebiegu splicingu. BRR2A jest zależną od ATP helikazą RNA, która stanowi integralny składnik U5 snRNP wymaganego do aktywacji spliceosomu (114). PRP8 natomiast jest podstawowym składnikiem spliceosomu, który reguluje u roślin splicing RNA COOLAIR, długiego niekodującego RNA, blokującego ekspresję FLOWERING LOCUS C (FLC) podczas ekspozycji rośliny na zimno (115). Innym powodem niewielkiej liczby zmian w splicingu w badanym mutancie może być fakt występowania bardzo wielu helikaz typu DEAD-box, które w przypadku regulacji splicingu mogą się łatwiej zastępować niż w przypadku regulacji innych procesów. Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują na udział badanych helikaz w splicingu tylko niewielkiej, wyselekcjonowanej grupy transkryptów. Mechanizm ich działania wymaga jednak dalszych analiz.

6.6. Wpływ helikaz DRH1, RH46 i RH40 na strukturę pre-miRNA

W 2018 roku pokazano, że helikaza CHR2 wpływa na strukturę ośmiu pre-miRNA. Efekt braku tej helikazy był różny dla różnych prekursorów. Brak CHR2 powodował zmianę rozgałęzionej pętli końcowej w strukturę liniowej spinki w przypadku pre-miR166a i pre-miR168a, lub powodował wydłużenie dolnego rejonu dwuniciowego z 9nt do 16nt w przypadku pre-miR168b. Wydłużenie tego fragmentu dwuniciowego powoduje, że dupleks miRNA/miRNA* znajduje się w odległości 15-17 nt od dolnej pętli, pozwalając na obróbkę prekursora. Zmiana ta skutkuje wzrostem poziomu miR168b w mutancie *chr2-1* (59). Na podstawie wyników sekwencjonowania NGS małych RNA, wybrano kilka prekursorów do badań ich struktury drugorzędowej. Skoncentrowano się na prekursorach tych miRNA, których poziom dojrzałej cząsteczki był podwyższony w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w obu lub tylko jednym z zastosowanych warunków temperaturowych. Spośród kilkunastu wybranych prekursorów otrzymano wystarczającą liczbę odczytów dla pięciu prekursorów, które użyto do przewidywania ich struktur drugorzędowych. Są to: pre-miRNA160a, pre-miRNA166a, pre-miR399c, pre-miRNA2111a oraz pre-miRNA2112.

Wyniki analizy reaktywności DMS pokazały, że zmiany spowodowane przez brak badanych helikaz były odmienne dla różnych prekursorów. W przypadku pre-miRNA166a, którego poziom dojrzałej cząsteczki nie zmienił się w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*

hodowanym w obu temperaturach i stanowił kontrolę przeprowadzanego eksperymentu, nie zaobserwowano zmian w rejonie trzonu struktury spinki. Znaczne zmiany odnotowano natomiast w górnej części prekursora: powyżej 63 nt u mutantu hodowanego w 22°C oraz powyżej 58 nt u mutantu hodowanego w 16°C (ryc. 44, ryc. 45). Pri-miRNA166a podlega obróbce w obu kierunkach: obróbka od podstawy do pętli prowadzi do uwolnienia dojrzałego miRNA, a obróbka od pętli do podstawy skutkuje cięciem w obrębie sekwencji miRNA (61). Zmiany w obrębie pętli mogły zatem nie wpływać na obróbkę prekursora, co może tłumaczyć brak różnic w akumulacji miRNA166a w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*.

Eksperyment celowanego DMS-MaPseq ujawnił natomiast występowanie zmian w dolnej części struktury spinki pre-miRNA160a (ryc. 48, ryc. 49). Trzon spinki, jak i wielkość pętli końcowej przy braku badanych helikaz pozostały bez zmian. Pre-miRNA160a ulega obróbce w kierunku od pętli do podstawy (65). Umieszczenie zmian w dolnej części prekursora może zatem nie wpływać na jego dojrzewanie, co może tłumaczyć brak różnic w akumulacji dojrzałego poziomu miRNA160a. W mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 22°C zauważono natomiast istotny statystycznie, ale bardzo niewielki wzrost poziomu miRNA160a*.

Wyraźne różnice w strukturze prekursora pomiędzy rośliną typu dzikiego a mutantem *drh1-1 rh46-1 rh40-1* zaobserwowano w przypadku pre-miRNA2111a (ryc. 56, ryc. 57). U roślin hodowanych w temperaturze 22°C widać zmiany w pętli górnej prekursora pomiędzy rośliną typu dzikiego oraz mutantem. Ponadto, w roślinie typu dzikiego występuje bardzo mocno niesparowana cytozyna w pozycji 117, która nie wykazuje prawie żadnej reaktywności na DMS w potrójnym mutancie. Cytozyna ta znajduje się w obrębie dupleksu miRNA/miRNA*, więc jej sparowanie może znacząco wpływać na wydajność wycinania miR2111a. Warto zauważyć, że poziom miR2111a-3p w tych warunkach w mutancie wzrasta prawie dwuipółkrotnie ($\log_2FC=1,35$). Warto również zauważyć, że u roślin typu dzikiego hodowanych w 16°C pre-miRNA2111a posiada dużą pętlę wewnętrzną u podstawy spinki (11-15/144-148), pętla ta prawie całkowicie zanika w mutancie badanych helikaz hodowanym w tych samych warunkach. Jeśli pre-miRNA2111a jest procesowane od podstawy to pętla ta może wprowadzać możliwość wprowadzania przez DCL1 nieproduktywnego cięcia przypadającego w obrębie miRNA/miRNA*. Brak tej pętli może być istotny dla wydajnego cięcia tego prekursora przez DCL1. Warto zaznaczyć, że dojrzała cząsteczka miRNA2111a-3p w tych warunkach hodowli w mutancie badanych helikaz wzrasta ponad 7 krotnie ($\log_2FC=2,88$) w porównaniu do rośliny typu dzikiego. Kierunek

przetwarzania tego prekursora nie jest jednak jeszcze zbadany, jednak widać, że zmiany te pozytywnie wpłynęły na ekspresję miRNA2111a. Dodatkowo, analiza pre-miRNA2111a dostarczyła obserwacji dotyczących wpływu temperatury otoczenia na strukturę prekursora. W tym przypadku zaobserwowano różnice w reaktywności DMS u roślin typu dzikiego pomiędzy temperaturami, co wskazuje, że obniżona temperatura sprzyja parowaniu zasad i zwiększeniu udziału regionów dwuniciowych.

W pre-miRNA2112 u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 22°C nie odnotowano znaczących zmian w strukturze (ryc. 60, ryc. 61). Obecna u roślin typu dzikiego duża pętla końcowa ulega u mutantu badanych helikaz nieznacznemu zmniejszeniu na skutek powstania krótkiego odcinka dwuniciowego zakończonego niewielką pętlą. Niewielkie zmiany w strukturze drugorzędowej pre-miRNA2112 znajdują odzwierciedlenie w poziomie dojrzałej cząsteczki, której poziom u potrójnego mutantu helikazowego nie zmienia się istotnie. U roślin hodowanych w obniżonej temperaturze można natomiast zauważyć występowanie istotnych różnic. Po pierwsze, struktura pre-miRNA2112 w roślinie typu dzikiego hodowanej w 16°C odbiega od tej, którą przyjmuje prekursor w roślinie typu dzikiego hodowanej w standardowych warunkach: duża pętla końcowa obecna w pre-miRNA2112 zostaje przekształcona w trzy mniejsze pętle. Oznacza to, że struktura pre-miRNA2112 jest zależna od temperatury otoczenia. Po drugie, u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* trzy pętle końcowe ulegają przekształceniu w jedną dużą pętlę, która przypomina strukturę pre-miRNA2112 występującą u rośliny typu dzikiego hodowanej w 22°C. Warto zauważyć, że poziom miRNA2112 u mutantu badanych helikaz hodowanego w 16°C wzrasta prawie dwu i półkrotnie ($\log_2FC=1,22$). Wiadomym jest też, że pre-miRNA2112 jest przetwarzany od pętli do podstawy (65). Możliwym jest więc, że duża pętla końcowa jest istotna dla obróbki prekursora, a jej przywrócenie w potrójnym mutancie helikazowym sprzyja jego sprawnemu dojrzewaniu i prowadzi do podwyższenia poziomu dojrzałej cząsteczki.

Podczas dalszych analiz wyników eksperymentu DMS-MaPseq zaobserwowano zmiany w górnej pętli oraz rejonie trzonu spinki pre-miRNA399c (ryc. 52, ryc. 53). U mutantu hodowanego w standardowych warunkach, duża pętla końcowa obecna u rośliny typu dzikiego uległa przekształceniu w dwie mniejsze pętle połączone krótkim odcinkiem dwuniciowym. W rejonie dupleksu miRNA/miRNA* zauważyć można natomiast przekształcenie niewielkiego wybrzuszenia obecnego u roślin typu dzikiego w dwa mniejsze. U mutantu hodowanego w obniżonej temperaturze, duża pętla końcowa jest nadal

obecna. Zauważyć można występowanie dodatkowego wybrzuszenia w rejonie dupleksu miRNA/miRNA*, które nie jest obecne u roślin typu dzikiego. Niewielka liczba nukleotydów modyfikowanych przez DMS w pre-miRNA399c u rośliny typu dzikiego i mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* sugeruje, że struktura tego prekursora jest silnie dwuniciowa. Wyjątek stanowi adenina w pozycji 107, zlokalizowana w środkowej części dupleksu miRNA/miRNA*, która zarówno u rośliny typu dzikiego jak i mutantu hodowanych w obu temperaturach jest silnie modyfikowana. Oznacza to, że adenina ta jest bardzo często niesparowana i stanowi ważny element strukturalny dla obróbki prekursora. Pre-miRNA399c jest przetwarzane w kierunku od podstawy do pętli (66), a poziom dojrzałego miRNA399c w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* znacząco wzrasta u roślin hodowanych w 16°C. Wymodelowane na podstawie wyników eksperymentu DMS-MaPseq struktury pre-miRNA399c nie wykazują istotnych różnic pomiędzy roślinami typu dzikiego a mutantem badanych helikaz, mimo występowania znaczących różnic w reaktywności DMS dla poszczególnych nukleotydów. Możliwym jest, że pre-miRNA399c tworzy alternatywne struktury drugorzędowe, a do ich zbadania konieczne jest wykorzystanie metod, które je wyodrębnią. Jedną z takich metod jest DREMM, który pozwala rozróżnić wiele konformacji RNA utworzoną przez tę samą sekwencję *in vivo* (116).

Dalsze analizy wyników eksperymentu DMS-MaPseq pozwoliły na poczynienie kilku ciekawych obserwacji. W pre-miRNA2111a zaobserwowano wysoką reaktywność DMS w obrębie dupleksu miRNA/miRNA* u rośliny typu dzikiego hodowanej w 22°C, której nie odnotowano u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w tych samych warunkach. Wskazuje to na występowanie większej liczby niedopasowanych nukleotydów w rejonie dupleksu miRNA/miRNA* u rośliny typu dzikiego. Pokazano, że mniejsza liczba niedopasowanych nukleotydów zlokalizowana w duplesie miRNA/miRNA* usprawnia obróbkę prekursora i skutkuje zwiększeniem poziomu dojrzałych miRNA (71). Dane te sugerują zatem, że obecność helikaz powoduje występowanie większej ilości wybrzuszeń w rejonie dupleksu i prowadzi do obniżenia poziomu dojrzałego miRNA2111a u rośliny typu dzikiego. Brak badanych helikaz skutkuje zwiększeniem parowania zasad w rejonie dupleksu i podwyższeniem poziomu dojrzałego miRNA. W przypadku pre-miRNA399c z kolei, odnotowano wzrost reaktywności DMS, czyli większą liczbę niedopasowanych nukleotydów, w duplesie miRNA/miRNA* u potrójnego mutantu helikazowego w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Tutaj natomiast zwiększenie niedopasowań ma miejsce przy braku helikaz. Rezultat tej zmiany jest przeciwny niż dla miRNA2111a i

opublikowanych danych: zwiększenie ilości wybrzuszeń prowadzi do podwyższenia poziomu miRNA399c. W pre-miRNA2112 zaobserwowano zwiększoną reaktywność DMS w rejonie dupleksu w potrójnym mutancie helikazowym dla pojedynczych nukleotydów. Więcej niedopasowań odnotowano natomiast w rejonie powyżej dupleksu miRNA/miRNA*. Zmiany te jednak także doprowadziły do wzrostu poziomu dojrzałego miRNA. Wyniki dla miRNA399c oraz miRNA2112 sugerują zatem, że wpływ zmian w strukturze dupleksu miRNA/miRNA* na biogenezę miRNA nie jest decydujący, a na obróbkę prekursora wpływają także inne czynniki i elementy struktury pri-miRNA, takie jak wielkość pętli końcowej. Może o tym również świadczyć fakt, że w przypadku pre-miRNA2111a u mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanego w 16°C, zaobserwowaną dużą zmianę w górnej części prekursora: duża pętla zlokalizowana od 50 nt u roślin typu dzikiego uległa zmniejszeniu u mutantu. Mniej natomiast zmian zaobserwowano w trzonie spinki. Mimo to, poziom miRNA2111a znacznie wzrósł w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C. Trudno jest zatem ocenić, który element strukturalny prekursora jest ważniejszy dla jego obróbki. W każdym jednak z opisanych przypadków zmiany w strukturze prekursorów spowodowane brakiem helikaz skutkowały wzrostem poziomu dojrzałych miRNA. Możliwym jest, że te niewielkie zmiany w strukturze ułatwiły wiązanie prekursora przez Mikroprocesor i usprawiły jego obróbkę prowadząc ostatecznie do podwyższenia poziomu miRNA niezależnie od kierunku przetwarzania ich pri-miRNA. Warto jednak podkreślić, że w komórce RNA przyjmuje kilka alternatywnych struktur drugorzędowych i uzyskane wyniki stanowią rezultat połączenia ich w jedną strukturę. Ponadto, DMS modyfikuje nukleotydy, które nie są związane przez białka. Zmiany w reaktywności DMS pomiędzy rośliną typu dzikiego i potrójnym mutantem helikazowym mogą zatem wynikać nie tylko ze zmiany struktury, ale i ze zmiany miejsc wiązania RNA przez białka.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane helikazy wpływają na struktury pre-miRNA, nie działają jednak na każdy z badanych prekursorów w taki sam sposób. Podobny wynik zaobserwowano dla helikazy CHR2: jej brak nie skutkowało występowaniem jednego wzorca zmian u badanych prekursorów. Uzyskany wynik może być spowodowany tym, że helikazy DEAD-box, niewykazujące specyficzności sekwencji, rozplatają i wiążą się do różnych fragmentów prekursorów zależnie od oddziałujących z nimi białek, które naprowadzają helikazy na odpowiednie miejsca w prekursorze. Dodatkowo, wiadomym jest także, że helikazy z rodziny DEAD-box zdolne są do zmiany kompozycji kompleksów białko-RNA

(77). Możliwym jest, że obecność helikaz uniemożliwia związanie się odpowiednich, innych niż składniki Mikroprocesora, białek do prekursora, co wpływa na strukturę cząsteczki i jej dalszą obróbkę.

6.7. Czy helikazy DRH1, RH46 i RH40 są zaangażowane w regulację genów związanych z odpowiedzią rośliny na stres niedoboru fosforu lub inne stresy?

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy wykazały, że znaczna część miRNA, które akumulowały w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* w 22°C i/ albo 16°C są związane z reakcją roślin na niedobór Pi. Jednym z najsilniej indukowanych przez ten stres miRNA są cząsteczki z rodziny miRNA399, których poziom w *drh1-1 rh46-1 rh40-1* wzrósł kilkukrotnie. Mimo to, nie zaobserwowano obniżenia poziomu ich cząsteczki docelowej mRNA PHO2. Jednocześnie, podwyższeniu nie ulega poziom IPS1 i At4, które wiążą komplementarne do nich miRNA399 i blokują w ten sposób ich aktywność (22). Ponadto, w roślinach typu dzikiego, poziom miRNA399 wzrasta w stresie fosforowym około 20 razy (14), podczas gdy w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* odnotowano wzrost poziomów tych miRNA dwu- lub czterokrotny. Wynik ten sugeruje, że wzrost poziomu miRNA związanych z reakcją rośliny na stres niedoboru Pi nie wynika z niedoboru tego składnika w roślinie, a raczej z zaburzenia procesu ich biogenezy spowodowanych brakiem badanych helikaz. Ciekawy wynik otrzymano również dla miRNA398b i miRNA398c. Wzrostowi poziomu ich prekursorów towarzyszył wzrost poziomu dojrzałych cząsteczek u potrójnego mutantu helikazowego hodowanego w 16°C. W warunkach niedoboru fosforanów poziom dojrzałych miRNA398b i miRNA398c obniża się (14). Rezultat ten dodatkowo wspiera hipotezę, że to brak badanych helikaz wpływa na poziom tych miRNA i nie jest on skutkiem niedoboru fosforanów. Warto tutaj zaznaczyć, że aktywność helikaz z rodziny DEAD-box zależy od ATP. Wiadomo, że w warunkach niedoboru fosforanów poziomy ATP, ADP i pokrewnych nukleozydów spadają o 80% (117). Możliwe, że w warunkach niedoboru fosforanów, gdy poziom ATP drastycznie spada, helikazy, które potrzebują energii z hydrolizy ATP do uwolnienia ssRNA po rozpleceniu dwuniciowego RNA, pozostają związane z RNA. Uniemożliwia im to związanie i rozplecenie kolejnej cząsteczki. Brak aktywnych, niezwiązanych z RNA helikaz skutkuje podwyższeniem poziomu dojrzałych miRNA. Podobna sytuacja ma miejsce w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1*, w którym badane helikazy nie występują wcale. Dodatkowo, analiza GO wykazała, że wśród genów o zmienionej ekspresji w mutancie *drh1-1 rh46-1 rh40-1* hodowanym w 16°C, w porównaniu z roślinami

typu dzikiego, szczególnie silnie reprezentowane są geny zaangażowane w odpowiedzi rośliny na stresy związane z brakiem bądź niedoborem składników odżywczych. Wynik ten sugeruje, że helikazy DRH1, RH46 i RH40 mogą być zaangażowane w regulację odpowiedzi rośliny nie tylko na stres niedoboru fosforanów, ale także innych mikro- i makroskładników. W Zakładzie Ekspresji Genów zaplanowano wykonanie serii eksperymentów badających wrażliwość potrójnego mutantu *drh1-1 rh46-1 rh40-1* na rozmaite stresy, zarówno hodowanemu w temperaturze 22°C, jak i w 16°C.

7. Podsumowanie

1. Helikazy RNA z rodziny DEAD-box: DRH1, RH46 i RH40 oddziałują bezpośrednio z białkiem SERRATE (SE).
2. DRH1 oddziałuje z domeną CTD RNAP II. Domena WW helikazy DRH1 nie jest zaangażowana w oddziaływanie DRH1/ RNAP II.
3. DRH1 oddziałuje z białkiem ARGONAUTE1 (AGO1).
4. DRH1 jest białkiem wchodzącym w skład wielu kompleksów zaangażowanych w różne procesy związane z metabolizmem RNA.
5. Helikazy DRH1, RH46 i RH40 mają wpływ na przebieg biogenezy wybranych miRNA u *A. thaliana*.
6. Helikazy DRH1, RH46 i RH40 wpływają na strukturę drugorzędową prekursorów miRNA u roślin, co może wpływać na wydajność procesu ich dojrzewania i na poziom dojrzałych cząsteczek miRNA.

8. Literatura

1. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, *75*(5), 843-854.
2. Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development*, *16*(13), 1616-1626.
3. Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, *425*(6955), 257-263.
4. Koyama, T., Sato, F., & Ohme-Takagi, M. (2017). Roles of miR319 and TCP transcription factors in leaf development. *Plant physiology*, *175*(2), 874-885.
5. Schommer, C., Debernardi, J. M., Bresso, E. G., Rodriguez, R. E., & Palatnik, J. F. (2014). Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular plant*, *7*(10), 1533-1544.
6. Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U. & Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS biology*, *6*(9), e230.
7. Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *cell*, *138*(4), 750-759.
8. Tiwari, B., Habermann, K., Arif, M. A., Weil, H. L., Garcia-Molina, A., Kleine, T., Muhlhaus, T. & Frank, W. (2020). Identification of small RNAs during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, *20*, 1-25.
9. Barciszewska-Pacak, M., Milanowska, K., Knop, K., Bielewicz, D., Nuc, P., Plewka, P., Pacak, A., Vazquez, F., Karlowski, W., Jarmolowski, A. & Szweykowska-Kulinska, Z. (2015). *Arabidopsis* microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*, *6*, 410.
10. Kawashima, C. G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y. N., Saito, K., Takahashi, H., & Dalmay, T. (2009). Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal*, *57*(2), 313-321.
11. Kawashima, C. G., Matthewman, C. A., Huang, S., Lee, B. R., Yoshimoto, N., Koprivova, A., Rubio-Somoza, I., Todesco, M., Rathjen, T., Saito, K., Takahashi, H.,

- Dalmay, T. & Kopriva, S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 66(5), 863-876.
12. Kamerlin, S. C., Sharma, P. K., Prasad, R. B., & Warshel, A. (2013). Why nature really chose phosphate. *Quarterly reviews of biophysics*, 46(1), 1-132.
 13. Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiology*, 116(2), 447-453.
 14. Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., Li, W. H. & Chiou, T. J. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant physiology*, 151(4), 2120-2132.
 15. Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Huang, Y. T., Su, C. L., & Chiou, T. J. (2006). *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiology*, 141(3), 1000-1011.
 16. Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., & Scheible, W. R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant physiology*, 141(3), 988-999.
 17. Pant, B. D., Musialak-Lange, M., Nuc, P., May, P., Buhtz, A., Kehr, J., Walther, D. & Scheible, W. R. (2009). Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant physiology*, 150(3), 1541-1555.
 18. Okumura, S., Mitsukawa, N., Shirano, Y., & Shibata, D. (1998). Phosphate transporter gene family of Arabidopsis thaliana. *DNA Research*, 5(5), 261-269.
 19. Mudge, S. R., Rae, A. L., Diatloff, E., & Smith, F. W. (2002). Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 31(3), 341-353.
 20. Park, B. S., Seo, J. S., & Chua, N. H. (2014). NITROGEN LIMITATION ADAPTATION recruits PHOSPHATE2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of Arabidopsis phosphate homeostasis. *The Plant Cell*, 26(1), 454-464.
 21. Bayle, V., Arrighi, J. F., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., Gonzalez, E., Paz-Ares, J. & Nussaume, L. (2011). Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *The Plant Cell*, 23(4), 1523-1535.
 22. Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J.A. & Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides

- a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics*, 39(8), 1033-1037.
23. Shin, H., Shin, H. S., Chen, R., & Harrison, M. J. (2006). Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *The Plant Journal*, 45(5), 712-726.
 24. Bajczyk, M., Jarmolowski, A., Jozwiak, M., Pacak, A., Pietrykowska, H., Sierocka, I., Swida-Barteczka, A., Szewc, L. & Szweykowska-Kulinska, Z. (2023). Recent insights into plant miRNA biogenesis: multiple layers of miRNA level regulation. *Plants*, 12(2), 342.
 25. Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A. & Szweykowska-Kulinska, Z. (2017). Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(3), e1403.
 26. Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant physiology*, 138(4), 2145-2154.
 27. Dong, Z., Han, M. H., & Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 9970-9975.
 28. Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current biology*, 12(17), 1484-1495.
 29. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., & Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current biology*, 15(16), 1501-1507.
 30. Bollman, K. M., Aukerman, M. J., Park, M. Y., Hunter, C., Berardini, T. Z., & Poethig, R. S. (2003). HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis.
 31. Baumberger, N., & Baulcombe, D. C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), 11928-11933.
 32. Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M. & Voinnet, O. (2018). Nucleo-cytosolic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant microRNA pathway. *Molecular Cell*, 69(4), 709-719.

33. Fang, Y., & Spector, D. L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Current Biology*, *17*(9), 818-823.
34. Liu, C., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2012). The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant physiology*, *159*(2), 748-758.
35. Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., & Yuan, Y. A. (2010). Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein–protein interaction. *Rna*, *16*(3), 474-481.
36. Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. W., & Ray, A. (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in plant science*, *7*(11), 487-491.
37. Kurihara, Y., Takashi, Y., & Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *Rna*, *12*(2), 206-212.
38. Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y., & Watanabe, Y. (2007). Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant and cell physiology*, *48*(9), 1243-1253.
39. Liu, C., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2012). The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant physiology*, *159*(2), 748-758.
40. Machida, S., Chen, H. Y., & Adam Yuan, Y. (2011). Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE. *Nucleic acids research*, *39*(17), 7828-7836.
41. Xie, D., Chen, M., Niu, J., Wang, L., Li, Y., Fang, X., Li, P. & Qi, Y. (2021). Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in Arabidopsis. *Nature Cell Biology*, *23*(1), 32-39.
42. Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D. D., Martin, C., & Clarke, J. (2006). SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO reports*, *7*(10), 1052-1058.
43. Prigge, M. J., & Wagner, D. R. (2001). The Arabidopsis SERRATE gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *The Plant Cell*, *13*(6), 1263-1280.
44. Grigg, S. P., Canales, C., Hay, A., & Tsiantis, M. (2005). SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis. *Nature*, *437*(7061), 1022-1026.

45. Jozwiak, M., Bielewicz, D., Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., & Bajczyk, M. (2023). SERRATE: a key factor in coordinated RNA processing in plants. *Trends in Plant Science*, 28(7), 841-853.
46. Speth, C., Szabo, E. X., Martinho, C., Collani, S., zur Oven-Krockhaus, S., Richter, S., Droste-Borel, I., Macek, B., Stierhof, Y.D., Schmid, M., Liu, C. & Laubinger, S. (2018). Arabidopsis RNA processing factor SERRATE regulates the transcription of intronless genes. *Elife*, 7, e37078.
47. Ma, Z., Castillo-González, C., Wang, Z., Sun, D., Hu, X., Shen, X., Potok, M.E. & Zhang, X. (2018). Arabidopsis serrate coordinates histone methyltransferases ATXR5/6 and RNA processing factor RDR6 to regulate transposon expression. *Developmental cell*, 45(6), 769-784.
48. Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J. U., Rättsch, G., & Weigel, D. (2008). Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8795-8800.
49. Raczynska, K. D., Simpson, C. G., Ciesiolka, A., Szewc, L., Lewandowska, D., McNicol, J., Szweykowska-Kulinska, Z., Brown, J.W.S. & Jarmolowski, A. (2010). Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*, 38(1), 265-278.
50. Raczynska, K. D., Stepień, A., Kierzkowski, D., Kalak, M., Bajczyk, M., McNicol, J., Simpson, C.G., Szweykowsk-Kulińska, Z., Brown, J.W.S. & Jarmolowski, A. (2013). The SERRATE protein is involved in alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Nucleic acids research*, 42(2), 1224-1244.
51. Bajczyk, M., Lange, H., Bielewicz, D., Szewc, L., Bhat, S. S., Dolata, J., Kuhn, L., Szweykowska-Kulinska, Z., Gagliardi, D. & Jarmolowski, A. (2020). SERRATE interacts with the nuclear exosome targeting (NEXT) complex to degrade primary miRNA precursors in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 48(12), 6839-6854.
52. Li, S., Li, M., Liu, K., Zhang, H., Zhang, S., Zhang, C., & Yu, B. (2020). MAC5, an RNA-binding protein, protects pri-miRNAs from SERRATE-dependent exoribonuclease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23982-23990.
53. Katahira, J. (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(6), 507-513.

54. Lange, H., Zuber, H., Sement, F. M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Brunaud, V., Berard, C., Bouteiller, N., Balzergue, S., Aubourg, S., Martin-Magniette, M.L., Vaucheret, H. & Gagliardi, D. (2014). The RNA helicases AtMTR4 and HEN2 target specific subsets of nuclear transcripts for degradation by the nuclear exosome in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, *10*(8), e1004564.
55. Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. & Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, *57*, 173-188.
56. Yang, S. W., Chen, H. Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N. H., & Yuan, Y. A. (2010). Structure of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Structure*, *18*(5), 594-605.
57. Lu, C., & Fedoroff, N. (2000). A mutation in the *Arabidopsis* HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *The Plant Cell*, *12*(12), 2351-2365.
58. Szarzynska, B., Sobkowiak, L., Pant, B. D., Balazadeh, S., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., Jarmolowski, A. & Szweykowska-Kulinska, Z. (2009). Gene structures and processing of *Arabidopsis thaliana* HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic acids research*, *37*(9), 3083-3093.
59. Wang, Z., Ma, Z., Castillo-González, C., Sun, D., Li, Y., Yu, B., ... & Zhang, X. (2018). SWI2/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via Serrate to impede miRNA production. *Nature*, *557*(7706), 516-521.
60. Li, Q., Liu, N., Liu, Q., Zheng, X., Lu, L., Gao, W., Liu, Y., Zhang, S., Wang, Q., Pan, J., Chen, C., Mi, Y., Yang, M., Cheng, X., Ren, G., Yuan, Y. & Zhang, X. (2021). DEAD-box helicases modulate dicing body formation in *Arabidopsis*. *Science Advances*, *7*(18), eabc6266.
61. Xu, C., Zhang, Z., He, J., Bai, Y., Cui, J., Liu, L., Tang, J., Tang, G., Chen, X. & Mo, B. (2023). The DEAD-box helicase RCF1 plays roles in miRNA biogenesis and RNA splicing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *116*(1), 144-160.
62. Li, S., Xu, R., Li, A., Liu, K., Gu, L., Li, M., Zhang, H., Zhang, Y., Zhuang, S., Wang, Q., Gao, G., Li, N., Zhang, C., Li, Y. & Yu, B. (2018). SMA1, a homolog of the splicing factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research*, *46*(17), 9148-9159.

63. Hou, X. L., Chen, W. Q., Hou, Y., Gong, H. Q., Sun, J., Wang, Z., Zhao, H., Cao, X., Song, X. & Liu, C. M. (2021). DEAD-BOX RNA HELICASE 27 regulates microRNA biogenesis, zygote division, and stem cell homeostasis. *The Plant Cell*, 33(1), 66-84.
64. Baek, S. C., Kim, B., Jang, H., Kim, K., Park, I. S., Min, D. H., & Kim, V. N. (2024). Structural atlas of human primary microRNAs generated by SHAPE-MaP. *Molecular Cell*, 84(6), 1158-1172.
65. Yan, X., Li, C., Liu, K., Zhang, T., Xu, Q., Li, X., Zhu, J., Wang, Z., Yusuf, A., Cao, S., Peng, X., Cai, J.J. & Zhang, X. (2024). Parallel degradome-seq and DMS-MaPseq substantially revise the miRNA biogenesis atlas in Arabidopsis. *Nature Plants*, 1-18.
66. Bologna, N. G., Mateos, J. L., Bresso, E. G., & Palatnik, J. F. (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO journal*, 28(23), 3646-3656.
67. Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Duan, L., Li, Z., Axtel, M.J., Wang, X.J. & Zhang, X. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nature structural & molecular biology*, 20(9), 1106-1115.
68. Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Xia, J., Chellappan, P., Zhou, X., Zhang, X. & Jin, H. (2010). Multiple distinct small RNAs originate from the same microRNA precursors. *Genome biology*, 11, 1-18.
69. Mateos, J. L., Bologna, N. G., Chorostecki, U., & Palatnik, J. F. (2010). Identification of microRNA processing determinants by random mutagenesis of Arabidopsis MIR172a precursor. *Current Biology*, 20(1), 49-54.
70. Moro B, Chorostecki U, Arikiti S, Suarez IP, Hobartner C, Rasia RM, Meyers BC, Palatnik JF. 2018. Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Res* 46, 10709- 10723.
71. Rosatti, S., Rojas, A. M., Moro, B., Suarez, I. P., Bologna, N. G., Chorostecki, U., & Palatnik, J. F. (2024). Principles of miRNA/miRNA* function in plant MIRNA processing. *Nucleic Acids Research*, gkae458.
72. Jarmoskaite, I., & Russell, R. (2011). DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(1), 135-152.
73. Rogers, G. W., Richter, N. J., & Merrick, W. C. (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12236-12244.

74. Rogers, G. W., Lima, W. F., & Merrick, W. C. (2001). Further characterization of the helicase activity of eIF4A: substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12598-12608.
75. Yang, Q., Del Campo, M., Lambowitz, A. M., & Jankowsky, E. (2007). DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Molecular cell*, 28(2), 253-263.
76. Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., & Yokoyama, S. (2006). Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein Drosophila Vasa. *Cell*, 125(2), 287-300.
77. Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., & Le Hir, H. (2005). The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature structural & molecular biology*, 12(10), 861-869.
78. Potratz, J. P., Del Campo, M., Wolf, R. Z., Lambowitz, A. M., & Russell, R. (2011). ATP-dependent roles of the DEAD-box protein Mss116p in group II intron splicing in vitro and in vivo. *Journal of molecular biology*, 411(3), 661-679.
79. Xing, Z., Ma, W. K., & Tran, E. J. (2019). The DDX5/Dbp2 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(2), e1519.
80. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G., & Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*, 454(7200), 56-61.
81. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G., & Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Molecular cell*, 39(3), 373-384.
82. Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529-533.
83. Connerty, P., Bajan, S., Remenyi, J., Fuller-Pace, F. V., & Hutvagner, G. (2016). The miRNA biogenesis factors, p72/DDX17 and KHSRP regulate the protein level of Ago2 in human cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(10), 1299-1305.
84. Ngo, T. D., Partin, A. C., & Nam, Y. (2019). RNA specificity and autoregulation of DDX17, a modulator of microRNA biogenesis. *Cell reports*, 29(12), 4024-4035.
85. Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J., & Furneaux, H. (2007). P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32773-32779.
86. Mingam, A., Toffano-Nioche, C., Brunaud, V., Boudet, N., Kreis, M., & Lecharny, A. (2004). DEAD-box RNA helicases in Arabidopsis thaliana: establishing a link between

- quantitative expression, gene structure and evolution of a family of genes. *Plant Biotechnology Journal*, 2(5), 401-415.
87. Bork, P., & Sudol, M. (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin?. *Trends in biochemical sciences*, 19(12), 531-533.
 88. Chen, H. I., & Sudol, M. (1995). The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7819-7823.
 89. Sudol, M. (1996). Structure and function of the WW domain. *Progress in biophysics and molecular biology*, 65(1-2), 113-132.
 90. Kang, C. H., Feng, Y., Vikram, M., Jeong, I. S., Lee, J. R., Bahk, J. D., Yun, D.J., Lee, S.Y. & Koiwa, H. (2009). Arabidopsis thaliana PRP40s are RNA polymerase II C-terminal domain-associating proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 484(1), 30-38.
 91. Palm, D., Streit, D., Shanmugam, T., Weis, B. L., Ruprecht, M., Simm, S., & Schleiff, E. (2019). Plant-specific ribosome biogenesis factors in Arabidopsis thaliana with essential function in rRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 47(4), 1880-1895.
 92. Okanami, M., Meshi, T., & Iwabuchi, M. (1998). Characterization of a DEAD box ATPase/RNA helicase protein of Arabidopsis thaliana. *Nucleic acids research*, 26(11), 2638-2643.
 93. Du, J., Gao, Y., Zhan, Y., Zhang, S., Wu, Y., Xiao, Y., Zou, B., He, K., Gou, X., Li, G., Lin, H. & Li, J. (2016). Nucleocytoplasmic trafficking is essential for BAK 1-and BKK 1-mediated cell-death control. *The Plant Journal*, 85(4), 520-531.
 94. Chicois, C., Scheer, H., Garcia, S., Zuber, H., Mutterer, J., Chicher, J., Hammann P., Gagliardi, G. & Garcia, D. (2018). The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 96(1), 119-132.
 95. Knop, K., Stepień, A., Barciszewska-Pacak, M., Taube, M., Bielewicz, D., Michalak, M., Borst, J.W., Jarmolowski, A. & Szweykowska-Kulinska, Z. (2017). Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of Arabidopsis microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic acids research*, 45(5), 2757-2775.
 96. Han, M. H., Goud, S., Song, L., & Fedoroff, N. (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(4), 1093-1098.

97. Koiwa, H., Hausmann, S., Bang, W. Y., Ueda, A., Kondo, N., Hiraguri, A., Fukuhara, T., Bahk, J.D., Yun, D.J., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. & Shuman, S. (2004). Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(40), 14539-14544.
98. Manavella, P. A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., & Weigel, D. (2012). Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell*, *151*(4), 859-870.
99. Zhang, S., Xie, M., Ren, G., & Yu, B. (2013). CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), 17588-17593.
100. Koester, T., Meyer, K., Weinholdt, C., Smith, L. M., Lummer, M., Speth, C., Grosse, I., Weigel, D. & Staiger, D. (2014). Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein At GRP7 in Arabidopsis. *Nucleic acids research*, *42*(15), 9925-9936.
101. Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., Dinh, T. T., Meyers, B. C., Mo, B. & Chen, X. (2012). The Arabidopsis nucleotidyl transferase HESO1 uridylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation. *Current Biology*, *22*(8), 689-694.
102. Ren, G., Chen, X., & Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in Arabidopsis. *Current Biology*, *22*(8), 695-700.
103. Baumberger, N., & Baulcombe, D. C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(33), 11928-11933.
104. Yuan, W., Zhou, J., Tong, J., Zhuo, W., Wang, L., Li, Y., Sun, Q. & Qian, W. (2019). ALBA protein complex reads genic R-loops to maintain genome stability in Arabidopsis. *Science Advances*, *5*(5), eaav9040.
105. Dolata, J., Bajczyk, M., Bielewicz, D., Niedojadlo, K., Niedojadlo, J., Pietrykowska, H., Walczak, W., Szweykowska-Kulinska, Z. & Jarmolowski, A. (2016). Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiology*, *172*(1), 297-312.
106. Streitner, C., Köster, T., Simpson, C. G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J. W., & Staiger, D. (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in Arabidopsis thaliana. *Nucleic acids research*, *40*(22), 11240-11255.

- 107.Li, S., Liu, K., Zhou, B., Li, M., Zhang, S., Zeng, L., Zhang, C. & Yu, B. (2018). MAC3A and MAC3B, two core subunits of the MOS4-associated complex, positively influence miRNA biogenesis. *The Plant Cell*, 30(2), 481-494.
- 108.Li, S., Li, M., Liu, K., Zhang, H., Zhang, S., Zhang, C., & Yu, B. (2020). MAC5, an RNA-binding protein, protects pri-miRNAs from SERRATE-dependent exoribonuclease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23982-23990.
- 109.Stepien, A., Dolata, J., Gulanicz, T., Bielewicz, D., Bajczyk, M., Smolinski, D. J., Szweykowska-Kulinska, Z. & Jarmolowski, A. (2022). Chromatin-associated microprocessor assembly is regulated by the U1 snRNP auxiliary protein PRP40. *The Plant Cell*, 34(12), 4920-4935.
- 110.Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X. & Cao, X. (2013). NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(2), 715-727.
- 111.Fang, X., Cui, Y., Li, Y., & Qi, Y. (2015). Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. *Nature Plants*, 1(6), 1-9.
- 112.Kokolo, M., & Bach-Elias, M. (2022). P68 RNA Helicase (DDX5) Required for the Formation of Various Specific and Mature miRNA Active RISC Complexes. *Microrna (Sharjah, United Arab Emirates)*, 11(1), 36.
- 113.Ré, D. A., Lang, P. L., Yones, C., Arce, A. L., Stegmayer, G., Milone, D., & Manavella, P. A. (2019). Alternative use of miRNA-biogenesis co-factors in plants at low temperatures. *Development*, 146(5), dev172932.
- 114.Raghubathan, P. L., & Guthrie, C. (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Current biology*, 8(15), 847-855.
- 115.Marquardt, S., Raitskin, O., Wu, Z., Liu, F., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Functional consequences of splicing of the antisense transcript COOLAIR on FLC transcription. *Molecular cell*, 54(1), 156-165.
- 116.Camara, M. B., Lange, B., Yesselman, J. D., & Eichhorn, C. D. (2024). Visualizing a two-state conformational ensemble in stem-loop 3 of the transcriptional regulator 7SK RNA. *Nucleic Acids Research*, 52(2), 940-952.
- 117.Duff, S. M., Moorhead, G. B., Lefebvre, D. D., & Plaxton, W. C. (1989). Phosphate starvation inducible 'bypasses' of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in Brassica nigra suspension cells. *Plant Physiology*, 90(4), 1275-1278.

118. Zielezinski, A., Dolata, J., Alaba, S., Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Knop, K., Stepień, A., Bielewicz, D., Pietrykowska, H., Sierocka, I., Sobkowiak, L., Lakomiak, A., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z. & Karłowski, W. M. (2015). mirEX 2.0-an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs. *BMC plant biology*, *15*, 1-9.
119. Bücherl, C., Aker, J., de Vries, S., & Borst, J. W. (2010). Probing protein–protein interactions with FRET–FLIM. *Plant Developmental Biology: Methods and Protocols*, 389-399.
120. Kuhn, L., Vincent, T., Hammann, P., & Zuber, H. (2021). Exploring protein interactome data with IPinquiry: statistical analysis and data visualization by spectral counts. In *Statistical Analysis of Proteomic Data: Methods and Tools* (pp. 243-265). New York, NY: Springer US.
121. Eminaga, S., Christodoulou, D. C., Vigneault, F., Church, G. M., & Seidman, J. G. (2013). Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing. *Current protocols in molecular biology*, *103*(1), 4-17.
122. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, *15*, 1-21.
123. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.
124. Garcia-Campos, M. A., & Schwartz, S. (2024). txtools: an R package facilitating analysis of RNA modifications, structures, and interactions. *Nucleic Acids Research*, *52*(8), e42-e42.
125. Reuter, J. S., & Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC bioinformatics*, *11*, 1-9.
126. Darty, K., Denise, A., & Ponty, Y. (2009). VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, *25*(15), 1974.