

Monika Józwiak

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

Streszczenie

MikroRNA (miRNA) to krótkie, jednoniciowe i niekodujące RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. W proces ich powstawania zaangażowanych jest wiele białek. Za najważniejsze uznaje się DICER LIKE1 (DCL1), HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) oraz SERRATE (SE), które tworzą rdzeń maszynerii zwanej Mikroprocesorem. Wcześniejsze analizy przeprowadzone przez Zakład Ekspresji Genów wykazały, że SE jest zasocjowane 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 rośliny *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 LS-MS/MS. Analiza interaktomu białkowego DRH1 wykazała, że DRH1 jest zasocjowane 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 a 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 opublikowanymi 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 kilku 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.