

Podsumowanie osiągnięć zawodowych

1. Imię i nazwisko: **Dawid Bielewicz**

2. Dyplomy, stopnie naukowe - w tym nazwa instytutu, który nadał stopień, rok nadania stopnia, tytuł rozprawy doktorskiej:

15.07.2015 - Doktorat w dziedzinie biotechnologii - Międzynarodowy Program Doktorancki (FNP) - Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i Uniwersytet w Bazylei

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Transkrypcyjna i potranskrypcyjna regulacja biogenezy mikroRNA u *Arabidopsis thaliana*"

06.2009 - Magister biologii molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

06.2007 – Licencjat z biologii ze specjalizacją Biologia Molekularna, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

10.2020 - obecnie

adiunkt i oraz kierownik projektu (OPUS 2022/45/b/NZ1/01273), Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

10.2016 - 09.2020

adiunkt i kierownik projektu (Sonata 2016/23/D/NZ1/00152), Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań

07.2015 - 07.2016

staż podoktorski- Uniwersytet Bielefeld, Wydział Biologii, Niemcy

10.2009-06.2015

doktorant - Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu i Uniwersytet w Bazylei (Międzynarodowy Program Doktorancki FNP)

4. Opis osiągnięć, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy

a) Tytuł osiągnięcia:

Nowe mechanizmy regulacji biogenezy mikroRNA *Arabidopsis thaliana*.

b) Prace włączone do wniosku habilitacyjnego.

1. **Bielewicz Dawid**, Kalak Małgorzata, Kalyna Maria, Windels David, Barta Andrea, Vazquez Franck, Szweykowska-Kulińska Zofia, Jarmołowski Artur. (2013). *Introny roślinnych pri-miRNA zwiększają biogenezę miRNA*. EMBO Reports. 14(7):622-8. 10.1038/embor.2013.62.

IF₂₀₂₃ = 9.421, punkty MNiSW: 140

2. Dolata Jakub, Taube Michał, Bajczyk Mateusz, Jarmołowski Artur, Szweykowska-Kulińska Zofia, **Bielewicz Dawid***. (2018). *Regulacja funkcji mikroprocesora roślinnego w kształtowaniu krajobrazu mikroRNA*. Frontiers in Plant Science. 5:9:753. doi: 10.3389/fpls.2018.00753.

*Autor korespondujący

IF₂₀₂₃ = 5,6, punkty MNiSW: 140

3. Bhat Susheel Sagar#, **Bielewicz Dawid#**, Gulanicz Tomasz, Bodi Zsuzsanna, Yu Xiang, Anderson Stephen J., Szewc Łukasz, Bajczyk Mateusz, Dolata Jakub, Grzelak Natalia, Smoliński Dariusz J., Gregory Brian D., Fray Rupert G., Jarmołowski Artur, Szweykowska-Kulińska Zofia. (2020). *mRNA metylaza adenozyiny (MTA) odkłada m6A na pri-miRNA w celu modulowania biogenezы miRNA w Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 117(35):21785-21795. doi: 10.1073/pnas.2003733117.

wspólny pierwszy autor

IF₂₀₂₃ = 11.1, punkty MNiSW: 200

4. **Bielewicz Dawid***, Dolata Jakub, Bajczyk Mateusz, Szewc Łukasz, Gulanicz Tomasz, Bhat Susheel Sagar, Karlik Anna, Józwiak Monika, Jarmołowski Artur, Szweykowska-Kulińska Zofia. (2023). *Hyponastic Leaves 1 współdziała z RNA Pol II w celu zapewnienia prawidłowej transkrypcji genów mikroRNA*. Plant and Cell Physiology. 64(6):571-582. doi: 10.1093/pcp/pcad032.

*Autor korespondujący

IF₂₀₂₃ = 4,9, punkty MNiSW: 140

Całkowita liczba cytowań artykułów na podstawie Google Scholar wynosi 1443, a na podstawie Web of Science 973.

Artykuł nr 1 oraz nr 4 zostały wyróżnione przez redaktora czasopisma, w którym zostały opublikowane. Oprócz naszego opublikowanego artykułu, ukazał się inny artykuł, autorstwa wiodącego w tej dziedzinie naukowca, zawierający opis i komentarz do naszych odkryć [1, 2].

- c) Opis celów naukowych i uzyskanych wyników, które doprowadziły do wyżej wymienionych publikacji.

Wprowadzenie

Prawie wszystkie komórki w żywym organizmie zawierają ten sam zestaw informacji DNA. Jednak komórki te mogą wyglądać zupełnie inaczej i mogą pełnić wiele różnych funkcji, na przykład: komórki neuronalne i wątrobowe u ssaków oraz komórki merystematyczne i komórki wchodzące w skład zespołu tkanek przewodzących u roślin. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest odmienna regulacja genów. Zestaw genów ulegających ekspresji (włączeniu) może być różny w różnych komórkach, nadając im unikalne właściwości. Pokazuje to, że precyzyjna i ścisła regulacja ekspresji genów jest niezwykle ważna. W komórkach eukariotycznych regulacja ta może być kontrolowana na różnych etapach, począwszy od dostępności chromatyny, transkrypcji, dojrzewania RNA, aż po translację i aktywność białek.

Większość eukariontów wykorzystuje również małe niekodujące RNA (sRNA, ang. *small RNA*) do regulacji ekspresji genów. W roślinach sRNA powstają w kilku różnych szlakach metabolicznych, które mają kilka wspólnych etapów [3]. Najlicniejszą klasą sRNA w roślinach są małe interferujące RNA (siRNA) o długości 24 nukleotydów (nt) [4]. U roślin, siRNA działają głównie na poziomie transkrypcyjnym w procesie polegającym na ukierunkowanej przez RNA metylacji DNA (RdDM, ang. *RNA-directed DNA methylation*) [5]. Drugą najlicniejszą klasą małych RNA są mikroRNA (miRNA). Cząsteczki te są krótkimi (o długości 19-24 nt) endogennymi RNA, które kontrolują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. MiRNA zostały zidentyfikowane u przedstawicieli wszystkich grup organizmów eukariotycznych i są uważane za podstawowe, zależne od sekwencji, elementy regulacyjne w ekspresji genów eukariotycznych [4, 6]. W 2024, Victor Ambros oraz Gary Ruvkun zostali uhonorowani Nagrodą Nobla za odkrycie cząsteczek mikroRNA. MiRNA są zaangażowane w szeroki zakres procesów metabolicznych, a zatem działają jako cząsteczki regulatorowe w ogólnym rozwoju roślin i odpowiedzi roślin na warunki środowiskowe [6-9]. Geny miRNA (*MIR*) są transkrybowane przez polimerazę RNA II (RNAPII) [10], oraz podobnie jak w przypadku genów kodujących białka, są one regulowane na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym w podobny sposób. Na przykład, zmiany w fosforylacji C-końcowej domeny polimerazy RNA II (CTD) przez kinazy CDKD i CDKF;1 modulują

transkrypcję, dodawanie czapeczki (ang. *RNA capping*) jest procesem ko-transkrypcyjnym, podlegającym poliadenylacji oraz splicingowi [11, 12]. Jednak wspólną i niezbędną cechą wszystkich pierwotnych transkryptów genów *MIR* (znanych jako pierwotne prekursor miRNA; pri-miRNA), która nie jest konieczna dla transkryptów genów kodujących białka, jest tworzenie rejonu typu spinki do włosów. Dojrzały mikroRNA jest osadzony w tym rejonie. Dojrzałe miRNA uwalniane są z pri-miRNA przez serię cięć przeprowadzonych przez kompleks białkowy zwany Mikroprocesorem [13, 14]. [13, 14]. Najważniejsze białka kompleksu Mikroprocesora (ang. *core proteins*) to: Dicer-Like 1 (DCL1), Serrate (SE) i Hyponastic Leaves 1 (HYL1).

Cele

Pytania, na które chciałem wówczas odpowiedzieć, były następujące:

- Czy białko HYL1, główny składnik kompleksu Mikroprocesora, jest zaangażowane w transkrypcję pri-miRNA, oprócz ich dojrzewania? Czy HYL1 bierze udział w transkrypcji innych genów zależnych od polimerazy RNA II, takich jak geny kodujące białka?
- Czy prekursor miRNA posiadają znacznik m⁶A, podobnie jak inne transkrypty polimerazy RNA II? Jeśli tak, to jaką rolę odgrywa ten epitranskryptomocny znacznik w metabolizmie prekursorów miRNA?
- Czy kompleks Mikroprocesora może działać już na etapie aktywnej transkrypcji genów *MIR*? Czy biogeneza mikroRNA jest ko-transkrypcyjna?

Wyniki

1. Białko HYL1 jest zaangażowane w biogenezę mikroRNA na początkowych etapach transkrypcji genów *MIR* (**publikacja 1**).

Jednym z podstawowych składników kompleksu Mikroprocesora u roślin jest białko HYL1. HYL1 odgrywa główną rolę w dojrzewaniu pri-miRNA do miRNA, ułatwiając rekrutację DCL1 (RNAzy) do struktury spinki do włosów występującej w pri-miRNA [15]. HYL1 zawiera dwie domeny wiążące dwuniciowy RNA (dsRBD ang. *double stranded RNA Binding Domain*) w rejonie N-końcowym, następnie sygnał lokalizacji jądrowej (NLS ang. *Nuclear Localization Signal*) i nieustrukturyzowany rejon C-końcowy [15]. Uważa się, że HYL1 tworzy homodimer i wiąże dupleks miRNA/miRNA* w pri-miRNA [16, 17]. Rośliny pozbawione ekspresji białka HYL1 posiadają plejotropowe zmiany fenotypowe w porównaniu do roślin typu dzikiego, m.in. defekty kształtu liści, czasu kwitnienia oraz

odpowiedzi na hormony roślinne takie jak auksyny i kwas abscysynowy [18, 19]. Do tej pory nie zidentyfikowano ortologa HYL1 w komórkach ssaków. Aktywność HYL1 jest regulowana na poziomie potranslacyjnym przez defosforylację przez fosfatazy CPL1 i PP4 oraz przez fosforylację przez kinazy MPK3 i SnRK2 [20-23]. Pablo Manavella i współpracownicy wykazali, że dwie reszty serynowe, które znajdują się w domenach wiążących dwuniciowy RNA, są miejscami działania fosfatazy CPL1 i są szczególnie ważne dla funkcji HYL1 [20]. Wykazali oni, że ekspresja allelu fosfomimikry HYL1 (S42D lub S159D) w mutancie typu *knock-out* HYL1 (*hyl1-2*) nie przywróciła w pełni fenotypu roślin typu dzikiego, ponieważ poziom dojrzałych mikroRNA nie został przywrócony. W kolejnych badaniach postawiono hipotezę, że hipofosforylowane białko HYL1 jest aktywne w biogenezie mikroRNA, a hiperfosforylowane białko HYL1 może tworzyć jądrową nieaktywną pulę rezerwową HYL1 [20, 24]. Szybka defosforylacja HYL1, po zmianie warunków środowiskowych, może błyskawicznie przywrócić aktywność HYL1 i produkcję miRNA. Zgadza się to z eksperymentami przeprowadzonymi na roślinach pozbawionych kinazy MPK3, w których fosforylacja (inaktywacja) HYL1 jest zmniejszona. W tym mutancie mikroRNA gromadzą się na wyższym poziomie w porównaniu do roślin typu dzikiego [22]. Jednak dane uzyskane przez Bognę Szarzyńską i jej współpracowników wykazały, że dla kilku pierwotnych prekursorów miRNA (pri-miRNA), w mutancie *hyl1-2* można zaobserwować akumulacje izoform posiadających niewycięty intron [25]. Co więcej, dobrze wiadomo, że usuwanie intronów przez spliceosom jest zdarzeniem ko-transkrypcyjnym, co oznacza, że splicing zachodzi przed zakończeniem syntezy powstającego RNA [26]. Obserwacje te nasunęły pytanie, czy białko HYL1 jest zaangażowane w transkrypcję pri-miRNA?

Białko HYL1 jest istotne dla prawidłowej transkrypcji genów MIR.

W celu sprawdzenia czy białko HYL1 odgrywa rolę w transkrypcji genów *MIR*, wykorzystałem system linii reporterowych *GUS*. Niezależnie skrzyżowałem rośliny z dwóch linii reporterowych, rośliny posiadające ekspresję genu *GUS* będącego pod kontrolą promotora genu *MIR*: pMIR393A lub pMIR393B [27], z mutantami *hyl1-2* (mutanty pozbawione ekspresji białka HYL1). Wyniki wykazały, że ekspresja genu *GUS* będącego pod kontrolą promotora genu *MIR* była znacznie obniżona w tle genetycznym *hyl1-2* w porównaniu do roślin typu dzikiego (WT). Używając RT-qPCR, zmierzyłem poziomy transkryptów genu *GUS* w liniach reporterowych pMIR393A:*GUS*, pMIR393B:*GUS*, pMIR393A:*GUS* x *hyl1-2* i pMIR393B:*GUS* x *hyl1-2* i zaobserwowałem

znaczny spadek poziomu transkryptów genu *GUS* w liniach reporterowych w tle genetycznym *hyl1-2*. Zaobserwowana redukcja poziomu transkryptów genu *GUS* sugeruje, że białko HYL1, które jest kluczowym białkiem dla dojrzewania pri-miRNA do mikroRNA, może również wpływać na transkrypcję genów *MIR*. Jednak możliwe jest również, że znaczna redukcja ekspresji *GUS* w tle genetycznym *hyl1-2* jest spowodowana mechanizmem sprzężenia zwrotnego. W tym scenariuszu globalna redukcja miRNA w *hyl1-2* może prowadzić do akumulacji mRNA potencjalnych czynników transkrypcyjnych, które następnie hamują transkrypcję genu *MIR393A* i *MIR393B*. W celu przetestowania tego scenariusza, postanowiłem przywrócić poziom miRNA w liniach reporterowych tle genetycznym *hyl1-2*. Skrzyżowałem wcześniej uzyskane rośliny pMIR393A:*GUS* x *hyl1-2* i pMIR393B:*GUS* x *hyl1-2* z roślinami posiadającymi mutację punktową w genie *DCL1*, allelu *DCL1-13*. Ekspresja allelu *DCL1-13* powoduje supresję fenotypu roślin *hyl1-2* poprzez przywrócenie poziomu ekspresji wielu miRNA do poziomu podobnego występującego u roślin typu dzikiego [28]. Mutacja punktowa w genie *DCL1* skutkuje substytucją aminokwasów z Glu na Lys w domenie ATPazy/DExH-box helikazy RNA. Wspomniana mutacja punktowa w genie *DCL1*, wpływa na zwiększenie aktywności *DCL1* pod nieobecność HYL1 [28]. Anna Karlik (współautorka publikacji), pod moim kierunkiem podczas realizacji swojej pracy licencjackiej, stworzyła heterozygotyczne rośliny (*hyl1-2 dcl1-13/DCL1*) niosące zmutowaną sekwencję genomową genu *DCL1* pod jego natywnym promotorem w tle mutantu *hyl1-2*. Następnie skrzyżowałem nasze linie reporterowe z utworzonymi roślinami transgenicznymi. Analiza barwienia *GUS* wyraźnie wykazała, że ekspresja białka *GUS* pozostaje nieefektywna w mutancie *hyl1-2 dcl1-13/DCL1*. Aby upewnić się, że obserwacje te nie są specyficzne dla rodziny miR393, skrzyżowałem cztery dodatkowe linie reporterowe *GUS* (pMIR157A:*GUS*, pMIR157C:*GUS*, pMIR161:*GUS*, pMIR163:*GUS*) z mutantem *hyl1-2*. Konsekwentnie zaobserwowałem, że ekspresja białka *GUS* będąca pod kontrolą promotora genu *MIR* była niższa w tle genetycznym *hyl1-2* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Obserwacje te potwierdzają koncepcję, że HYL1 działa jako bezpośredni pozytywny regulator transkrypcji genów *MIR*.

Białko HYL1 oddziałuje z czynnikami transkrypcyjnymi.

Biorąc pod uwagę, że białko HYL1 może być pozytywnym regulatorem transkrypcji genów *MIR*, postanowiłem sprawdzić czy HYL1 może oddziaływać z czynnikami transkrypcyjnymi. Do tego eksperymentu stworzyłem i wykorzystałem linię transgeniczną

charakteryzującą się ekspresją białka HYL1 z epitopem hemaglutyniny (HA) (pHYL1:HYL1:HA). Następnie wykorzystując przeciwciała anti-HA przeprowadziłem eksperyment ko-immunoprecypitacji białka HYL1 wraz z jego potencjalnymi partnerami białkowymi. Eksperymenty ko-immunoprecypitacji (co-IP) zostały przeprowadzone z pomocą Mateusza Bajczyka i Łukasza Szewca, współautorów publikacji. Identyfikacja białek oddziałujących z białkiem HYL1 została przeprowadzona poprzez wykorzystanie metod spektrometrii mas. Następnie porównałem uzyskane wyniki z wcześniej zidentyfikowanymi partnerami białkowymi białka HYL1. W analizie zidentyfikowałem opisane wcześniej białka, które oddziałują z HYL1 m.in. białko odpowiedzialne za transport HYL1 z cytoplazmy do jądra (KETCH1) oraz CDC5. Co ciekawe, z naszych wyników co-IP wynikało, że białko HYL1 oddziałuje również z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny TOPLESS. Białka z tej rodziny, w sumie pięciu członków, działają poprzez represję transkrypcji [29]. Warto wspomnieć, że wszyscy członkowie z rodziny TOPLESS zostali zidentyfikowani w eksperymencie co-IP. Możliwe jest, że oddziaływanie białka HYL1 z białkami z rodziny TOPLESS wpływa na ekspresję różnych zestawów genów. Niemniej jednak wymaga to bardziej szczegółowych badań.

*Chromatynowa dystrybucja polimerazy RNA II na genach MIR jest zaburzona w mutancie *hyl1-2*.*

Biorąc pod uwagę nasze odkrycia, że białko HYL1 może być zaangażowane w transkrypcję genów *MIR*, postanowiłem sprawdzić jego wpływ na chromatynową dystrybucję polimerazy RNA II na genach *MIR*. Wraz z Jakubem Dolatą (współautorem publikacji) przeprowadziliśmy eksperyment immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) w roślinach typu dzikiego oraz w mutancie *hyl1-2* wykorzystując przeciwciała (klon 8WG16) rozpoznające domenę CTD polimerazy RNA II. Następnie za pomocą qPCR porównałem dystrybucję polimerazy RNA II na wybranych genach *MIR* (około 200 par zasad (pz) przed miejscem startu inicjacji transkrypcji) w roślinach typu dzikiego oraz mutancie *hyl1-2*. Wyniki wykazały zmienioną dystrybucję polimerazy RNA II w kilku rejonach promotorowych genów *MIR*. Zaobserwowaliśmy zwiększoną akumulację polimerazy RNA II w rejonie ~200 pz przed miejscem startu transkrypcji (TSS, ang *Transcription Start Site*). Biorąc pod uwagę nasze wcześniejsze wyniki wskazujące na obniżenie transkrypcji reportera GUS w mutantach *hyl1-2*, sugeruje to, że akumulacja polimerazy RNA II na promotorach genów *MIR* w mutancie *hyl1-2* może wynikać z zatrzymania/zahamowania polimerazy RNA II w tych miejscach. Dodatkowo przeprowadziliśmy eksperymenty ChIP-seq, stosując te

same przeciwciała co wcześniej, jednak w celu globalnej analizy dystrybucji polimerazy RNA II zastosowaliśmy zamiast qPCR sekwencjonowanie nowej generacji na platformie firmy Illumina. Wyniki wykazały akumulację polimerazy RNA II w rejonie TSS oraz w obrębie genów *MIR* w mutantach *hyl1-2* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Podobne zatrzymanie/zahamowanie polimerazy RNA II w obrębie genów *MIR* zostało niedawno zaobserwowane w mutancie pozbawionego ekspresji białka PRP40, które jest zaangażowane w ko-transkrypcyjne dojrzewanie pri-miRNA [30] (**Publikacja 4**). W celu określenia czy białko HYL1 wiąże się do promotorów genów *MIR*, wykonałem eksperyment ChIP-qPCR, przy użyciu przeciwciała anty-HA w roślinach pHYL1: HYL1: HA oraz w roślinach typu dzikiego jako kontroli negatywnej. Szczegółowa analiza dystrybucji białka HYL1 na genach *MIR393A* i *MIR393B* wykazała pewne wzbogacenie badanych rejonów związanych z białkiem HYL1. Podobne wzbogacenie zaobserwowałem również dla sześciu wytypowanych promotorów genów *MIR* w rejonie ~200 pz przed miejscem inicjacji transkrypcji. Wyniki te sugerują, że białko HYL1 oddziałuje z promotorami genów *MIR* i może działać podczas inicjacji transkrypcji polimerazy RNA II.

Białko HYL1 oddziałuje z polimerazą RNA II.

Uzyskane wyniki skłoniły mnie do zadania pytania: na którym etapie transkrypcji działa białko HYL1. Zdecydowałem, że eksperymenty immunolokalizacyjne z przeciwciałami skierowanymi przeciwko HYL1 i polimerazie RNA II powinny dać właściwą odpowiedź. Użycie przeciwciał przeciwko specyficznie fosforylowanej domenie CTD polimerazy RNA II mogłoby dodatkowo zidentyfikować etap transkrypcji. Domena CTD zawiera wielokrotne 7-aminokwasowe powtórzenia. Na etapie inicjacji transkrypcji seryny nr 5 w powtórzeniach ulegają fosforylacji (Ser5P), natomiast fosforylacja seryn nr 2 (Ser2P) następuje na etapie wydłużenia transkrypcji. Tomasz Gulanicz (współautor publikacji) przeprowadził eksperymenty immunolokalizacyjne na utrwalonych jądrach komórkowych wyizolowanych z roślin typu dzikiego. Wyniki wskazują, że białko HYL1 kolokalizuje z polimerazą RNA II już na etapie inicjacji transkrypcji (przeciwciała rozpoznające Ser5P domeny CTD) oraz podczas etapu wydłużania transkrypcji (przeciwciała rozpoznające Ser2P domeny CTD). Wyniki te skłoniły do rozważenia hipotezy, że być może kolokalizacja białka HYL1 z polimerazą RNA II jest wynikiem oddziaływanie pomiędzy polimerazą RNA II, a innym członkiem kompleksu Mikroprocesora. Przed naszą publikacją wykazano, że białko SE i białko DCL1 są

bezpośrednio związane z chromatyną [31, 32]. Aby wykluczyć możliwość kolokalizacji HYL1 i polimerazy RNA II za pośrednictwem białka SE, zaproponowałem sprawdzenie kolokalizacji HYL1 z polimerazą RNA II w roślinach mutantów *se-2* (mutanty posiadające obniżony poziom białka SE). Ponadto, wspólnie z Tomaszem Gulaniczem przeprowadziliśmy eksperyment PLA (ang. *Proximity Ligation Assay*), aby sprawdzić czy HYL1 oddziałuje z polimerazą RNA II w roślinach typu dzikiego, mutancie *se-2* oraz homozygotycznych mutantach *dcl1-7*. We wszystkich przetestowanych roślinach zaobserwowaliśmy pozytywne sygnały w eksperymencie PLA, co wskazuje, że oddziaływanie HYL1 z polimerazą RNA II nie zależy od białka DCL1 lub białka SE. W celu potwierdzenia wyników PLA przy zastosowaniu innej techniki, użyłem roślin typu dzikiego, jako kontroli negatywnej, oraz roślin pHYL1:HYL1:HA do eksperymentów typu co-IP. Wyniki te pokazały, że największa podjednostka kompleksu polimerazy RNA II (fosforylowana przy Ser2 domeny CTD) znajduje się w immunoprecypitowanych kompleksach białka HYL1. W celu dokładniejszego zbadania tego oddziaływania, zdecydowaliśmy się użyć techniki mikroskopowej FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Przygotowałem niezbędne wektory do przeprowadzenia tego eksperymentu. Następnie Monika Józwiak (współautorka publikacji) wykonała w protoplastach *Arabidopsis thaliana* przejściową koekspresję białka HYL1 połączonego z białkiem czerwonej fluorescencji (RFP) i domeny CTD polimerazy RNA II połączonej z białkiem zielonej fluorescencji (GFP). Konstruktor z CTD zawierał również sygnał lokalizacji jądrowej, aby zapewnić, że domena CTD zostanie przetransportowana do jądra komórkowego. Pomimo tych wysiłków, w tym eksperymencie nie wykryliśmy oddziaływania między HYL1 a domeną CTD.

Oddziaływanie białka HYL1 z polimerazą RNA II zależy od statusu fosforylacji HYL1.

Na podstawie wyników wcześniejszych badań postawiłem hipotezę, że potranslacyjna modyfikacja HYL1 (fosforylacja) może wpływać na jego oddziaływanie z polimerazą RNA II. Wcześniejsze badania wykazały, że białko HYL1 ulega modyfikacjom, które wpływają na jego funkcję i lokalizację komórkową (Manavella i wsp. 2012, Achkar i wsp. 2018). Pozbawiona fosforylacji forma HYL1 jest aktywna w dojrzewaniu pri-miRNA, podczas gdy forma fosforylowana, zwłaszcza na serynie 42, nie może oddziaływać z RNA (**publikacja 3** w tym wniosku) i jest zlokalizowana głównie w jądrze. To doprowadziło mnie do pomysłu, że status fosforylacji HYL1 może różnicować jego rolę w transkrypcji od jego funkcji w dojrzewaniu pri-miRNA. W celu przetestowania tej hipotezy,

przygotowałem linie transgeniczne posiadające ekspresje HYL1 z mutacjami w dwóch krytycznych resztach serynowych (S42 i S159), zmieniając je na alaniny (pHYL1:HYL1:AA), aby naśladować stan defosforylacji, albo na kwasy asparaginowe (pHYL1:HYL1:DD), aby naśladować stan fosforylacji. Następnie przeprowadziliśmy eksperymenty PLA w celu ustalenia, czy HYL1 może oddziaływać z polimerazą RNA II i czy to oddziaływanie zależy od stanu fosforylacji HYL1. W roślinach posiadających ekspresję natywnej izoformy, jak i fosfomimetycznej HYL1, zaobserwowaliśmy liczne pozytywne sygnały w eksperymencie PLA, wskazujące, że HYL1 oddziałuje z RNA Pol II. Natomiast, w roślinach, w których ekspresji ulegała nieufosforylowana izoforma HYL1 zaobserwowaliśmy dużo mniej pozytywnych sygnałów.

Podsumowując, moi koledzy i ja wykazaliśmy, że HYL1 może funkcjonować nie tylko w dojrzewaniu pri-miRNA, ale także na poziomie transkrypcji genów *MIR*. Zgodnie z moją wiedzą, był to pierwszy dowód na związek między białkiem HYL1 a maszyną transkrypcyjną w komórkach roślinnych. Od czasu opublikowania tych wyników istniejące modele biogenezy mikroRNA stały się przestarzałe, a wielu autorów odpowiednio je dostosowało [2].

Dodatkowym wnioskiem było to, że białko HYL1 może być zaangażowane w transkrypcję genów kodujących białka; potrzebne są jednak dalsze eksperymenty, aby przetestować tę hipotezę.

2. Pri-miRNA posiadają znacznik m6A, który jest niezbędny do ich prawidłowego dojrzewania (**Publikacja 2**)

Najbardziej rozpowszechniona modyfikacja mRNA w komórkach eukariotycznych, N6-metyloadenozyna (m6A), może wpływać na ekspresję genów zarówno na poziomie ko-transkrypcyjnym, jak i post-transkrypcyjnym. Modyfikacja/znacznik m6A w zwierzęcych mRNA jest powiązana z różnymi procesami biologicznymi, w tym z rozwojem komórek, kancerogenezą i infekcjami wirusowymi. Znacznik m6A wpływa na podstawowe procesy dotyczące losu mRNA w komórce, m.in. splicing pre-mRNA, eksport mRNA, stabilność mRNA i zmiany w wydajności translacji [33, 34]. U *Arabidopsis thaliana* obecność znacznika m6A została po raz pierwszy udokumentowana w 2008 roku [35]. Dodatkowo zauważono, że obecność m6A w mRNA zależy od aktywności białka metylazy adenozyne mRNA (MTA), ortologa ludzkiego genu *METTL3* [35]. Jak wspomniano powyżej, wiele aspektów rozwoju i metabolizmu roślin jest kontrolowanych przez mikroRNA (miRNA),

jednak zauważyliśmy, że fenotyp roślin o niskiej metylacji (rośliny posiadające obniżony poziom białka MTA) ma aspekty przypominające mutanty szlaku biogenezy miRNA. To nasunęło hipotezę, że biogeneza mikroRNA oraz metabolizm m6A są ze sobą powiązane.

Obniżony poziom znacznika m6A skutkuje upośledzoną biogenezą miRNA.

W celu przetestowania hipotezy, że metabolizm m6A wpływa na biogenezę miRNA, zastosowaliśmy początkowo wysokoprzepustowe metody w celu zsekwencjonowania puli mikroRNA. Przygotowałem biblioteki małych RNA (długości 19-27 nt) z roślin typu dzikiego oraz hipomorficznych mutantów *mta*. Mutant *mta* ma znacznie obniżony poziom znacznika m6A, ponieważ jest to mutant posiadający ekspresję białka MTA tylko na etapie rozwoju embrionalnego. Rośliny pozbawione całkowitej ekspresji białka MTA są roślinami niezdolnymi do życia. Po sekwencjonowaniu i późniejszej analizie bioinformatycznej wyniki wykazały ogólny spadek liczby dojrzałych cząsteczek miRNA w mutantach *mta* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Zidentyfikowaliśmy 60 cząsteczek mikroRNA których poziom był znacząco zmieniony między roślinami typu dzikiego a mutantem *mta*. Spośród nich dla 51 cząsteczek poziom ten był znacznie obniżony w mutancie *mta*, a tylko dla dziewięciu z nich poziom był podwyższony w mutancie. Dodatkowo, obniżony poziom cząsteczek miRNA w roślinach *mta* został potwierdzona przez Susheela Sagara Bhata (współautora publikacji) przy zastosowaniu metody RT-qPCR dla sześciu wybranych miRNA.

Kolejnym pytaniem jaki zadaliśmy było: "Jaki jest poziom prekursorów miRNA w roślinach *mta*?". Aby zbadać poziomy pri-miRNA, wykorzystaliśmy platformę mirEX2, która została wcześniej opracowana przez naszą grupę (ze mną jako pierwszym autorem początkowej edycji bazy danych) [36, 37]. Platforma ta wykorzystuje repozytorium 298 par starterów specjalnie zaprojektowanych do ilościowego pomiaru ekspresji pri-miRNA *Arabidopsis* za pomocą RT-qPCR. Porównując wyniki RT-qPCR z danymi sekwencjonowania małych RNA, zidentyfikowaliśmy 20 par pri-miRNA/miRNA charakteryzujących się wyższym poziomem pri-miRNA i niższym miRNA w mutancie *mta* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Wyniki te wskazują na upośledzone dojrzewanie tych pri-miRNA w mutantach *mta*.

Pri-miRNA Arabidopsis thaliana posiadają znacznik m6A wprowadzany przez białko MTA.

Pojawiło się kolejne pytanie: czy pri-miRNA są bezpośrednio znakowane m6A, czy też ich zmieniony poziom jest pośrednim efektem braku białka MTA? W celu sprawdzenia stanu

metylacji pri-miRNA, Susheel Sagar Bhat i ja wykorzystaliśmy metodę m6A-IP-seq. W skrócie, użyliśmy przeciwciał rozpoznających znacznik m6A w RNA do immunoprecypitacji RNA z roślin typu dzikiego oraz mutantów *mta* (używanych jako kontrola negatywna). Następnie przygotowaliśmy biblioteki do wysokoprzepustowego sekwencjonowania. W celu sprawdzenia poprawnego działania naszego protokołu do immunoprecypitacji metylowanych cząsteczek RNA zastosowaliśmy dodatkowo dwie syntetyczne cząsteczki RNA. Jedna cząsteczka posiadała znacznik m6A, a druga nie. Obie te cząsteczki zostały dodane do całkowitej puli RNA przed samym procesem immunoprecypitacji. Po analizie bioinformatycznej danych zidentyfikowałem 11 transkryptów genów *MIR*, które były wzbogacone ponad 1,5-krotnie w roślinach typu dzikiego w porównaniu do mutantów *mta*, co wskazuje, że posiadają one znacznik m6A. Następnie Susheel Sagar Bhat sprawdził, czy te pri-miRNA są bezpośrednio związane z białkiem MTA. Susheel Sagar Bhat wykorzystał linie roślin posiadające ekspresję białka MTA w fuzji z białkiem GFP. W celu immunoprecypitacji kompleksów MTA wykorzystał przeciwciała anti-GFP, a następnie wykonał izolacje RNA z immunoprecypitowanych kompleksów. Następnie sprawdził, za pomocą RT-qPCR, wzbogacenie cząsteczek pri-miRNA w próbach MTA-GFP. Jako kontrole w eksperymencie zastosował rośliny posiadających ekspresję wolnego białka GFP. Uzyskane wyniki potwierdziły, że cząsteczki pri-miRNA posiadające znacznik m6A są bezpośrednio związane z białkiem MTA.

Obniżony poziom znacznika m6A zmienia strukturę typu spinki do włosów pri-miRNA oraz ich zdolność do wiązania się do białka HYL1.

Wiadomo, że modyfikacja m6A w cząsteczkach RNA może wpływać na ich strukturę drugorzędową [38]. Oczywistym pytaniem było, czy brak metylacji w pri-miRNA zmienia ich strukturę drugorzędową, prowadząc do niewłaściwego dojrzewania (akumulacji pri-miRNA i obniżenia poziomu dojrzałego mikroRNA, jak zaobserwowano w mutantach *mta*). W celu odpowiedzenia na to pytanie Brian Gregory i jego grupa wykorzystali metodę PIP-seq (wysokoprzepustowa metoda sprawdzająca strukturę drugorzędową RNA). Technika ta wykorzystuje RNazy rozpoznające dwuniciowe lub jednoniciowe RNA do identyfikacji rejonów dwuniciowych (strukturalnych) lub jednoniciowych w obrębie jednej cząsteczki RNA. Do naszych eksperymentów PIP-seq wykorzystaliśmy rośliny typu dzikiego i mutanty *mta*. Dane wykazały znaczące zmiany w strukturze drugorzędowej rejonów typu spinki do włosów pri-miRNA u mutantów *mta* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Co więcej, modele strukturalne uzyskane z PIP-seq sugerują, że rejony spinki do

włosów pri-miRNA zawierające miRNA mają tendencję do znajdowania się w niesparowanej konformacji pod nieobecność m6A (u mutantów *mta*), co może wyjaśniać niższe poziomy miRNA u mutantów *mta*. Postawiliśmy hipotezę, że te zmiany strukturalne mogą wpływać na wiązanie kompleksu Mikroprocesora z pri-miRNA. Aby to sprawdzić, zbadaliśmy wiązanie HYL1, głównego składnika kompleksu Mikroprocesora posiadającego dwie domeny wiążące dwuniciowy RNA, z prekursorami mikroRNA. Używając rośliny typu dzikiego i mutanty *mta*, przeprowadziłem immunoprecypitację kompleksów HYL1, a następnie izolację RNA z uzyskanych kompleksów i przygotowanie cDNA. Przy użyciu qPCR, odkryłem, że 7 z 10 testowanych pri-miRNA posiadało znacznie mniejsze wzbogacenie w kompleksach zawierających HYL1 w mutancie *mta* w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że brak znacznika m6A w pri-miRNA wpływa na jego strukturę, prowadząc do słabszego powinowactwa do HYL1 (i prawdopodobnie całego kompleksu Mikroprocesora), co skutkuje nieefektywnym dojrzewaniem pri-miRNA w dojrzałe mikroRNA.

MTA oddziałuje z polimerazą RNA II i działa na wczesnych etapach biogenezy miRNA.

Otrzymane wyniki doprowadziły nas do hipotezy, że MTA może funkcjonować na wczesnych etapach biogenezy miRNA, prawdopodobnie kotranskrypcyjnie. Wcześniejsze badania wykazały, że kotranskrypcyjna modyfikacja RNA (do m6A) wpływa na inne kotranskrypcyjne procesy dojrzewania mRNA, takie jak wybór miejsca poliadenylacji oraz splicing pre-mRNA [39, 40]. Wykazano, że w komórkach ssaków białko METTL3 wiąże się z polimerazą RNA II, gdy transkrypcja jest sztucznie spowolniona [41]. U *Arabidopsis thaliana* Susheel Sagar Bhat potwierdził kolokalizację MTA i polimerazy RNA II za pomocą immunolokalizacji, a następnie Tomasz Gulanicz potwierdził oddziaływanie między nimi *in vivo* za pomocą techniki PLA. Wyniki te wykazały bezpośrednie oddziaływanie między MTA i polimerazą RNA II w jądrach komórkowych. Dane te wskazują, że MTA wiąże się z polimerazą RNA II na wczesnym etapie transkrypcji i prawdopodobnie kotranskrypcyjnie metyluje pri-miRNA. Susheel Sagar Bhat wraz z Mateuszem Bajczykiem i Łukaszem Szewcem sprawdzili również, czy znane białka zaangażowane w biogenezę miRNA oddziałują z MTA. Wykorzystując mikroskopową technikę FRET, sprawdzili czy białko HYL1, białko CBP20, SE, TGH lub Dawdle (DDL1) oddziałują z białkiem MTA. Analiza FRET potwierdziła oddziaływanie między MTA i TGH, ale nie z innymi badanymi białkami. W ten sposób zidentyfikowaliśmy TGH jako partnera MTA w biogenezie miRNA.

Obniżony poziom m6A lub białka MTA upośledza tworzenie się kompleksu Mikroprocesora. Po zidentyfikowaniu TGH jako partnera białkowego MTA, zbadaliśmy status metylacji m6A pri-miRNA w mutancie *tgh*, mutant posiadający unieczynniony gen *TGH*. Susheel Sagar Bhat przeprowadził immunoprecypitację RNA z wykorzystaniem przeciwciała rozpoznającego m6A-metylowany RNA, a następnie poprzez RT-qPCR sprawdził status metylacji pri-miRNA w mutantach *tgh* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Zaobserwowaliśmy, że z wyjątkiem dwóch pri-miRNA, nie było ogólnego znaczącego zmniejszenia metylacji m6A w mutancie *tgh*. Wynik ten wskazuje, że białko TGH nie jest wymagane do metylacji m6A i że MTA działa prawdopodobnie powyżej białka TGH w szlaku biogenezy miRNA. Podczas biogenezy miRNA białko TGH wspomaga działanie białka DCL1 w przycinaniu pri-miRNA poprzez promowanie oddziaływania pri-miRNA z HYL1 [42]. Następnie sprawdziliśmy, czy brak białka MTA, a w konsekwencji utrata oddziaływania MTA-TGH, może wpłynąć na tworzenie się kompleksu Mikroprocesora. Wykorzystując technikę koimmunolokalizacji, Tomasz Gulanicz wykazał, że w mutancie *tgh* kolokalizacja DCL1 z RNA Pol II (fosforylowanym przy serynie 2) jest znacznie obniżona. Podobne obniżenie kolokalizacji DCL1 z RNA Pol II zaobserwowaliśmy również w mutancie *mta*. Dodatkowo, kolokalizacja HYL1 z polimerazą RNA II jest również obniżona w mutancie *mta*, podobnie jak w mutancie *tgh*. Obserwacje te sugerują, że brak białka TGH lub MTA utrudnia kolokalizację polimerazy RNA II z DCL1 i HYL1. Sugeruje to, że MTA ułatwia tworzenie się kompleksu Mikroprocesora poprzez przyciąganie białka TGH. Następuje to poprzez bezpośrednie oddziaływanie MTA-TGH z pri-miRNA lub zaangażowane w ten proces są jeszcze inne białka, które mogą „odczytywać” znacznik m6A w zmodyfikowanych pri-RNA.

MTA reguluje poziom miR393b, który jest zaangażowany w odpowiedź roślin na auksyny. W mutantach hipomorficznych białek kompleksu metylotransferazy m6A zaobserwowano defekty odpowiedzi tych roślin na hormon roślinny: auksynę [43]. Podczas dyskusji z Rupertem Fray'em (współautorem publikacji), zasugerowałem użycie auksynowego systemu reporterowego (DR5pro:GUS). Nasiona roślin posiadających wspomniany reporter (w tle genetycznym roślin typu dzikiego oraz mutantu *mta*) były dostępne w laboratorium Ruperta Fray'a. Konstrukcja DR5pro:GUS charakteryzuje się ekspresją genu *GUS* będącego pod kontrolą promotora składającego się z wielu powtórzeń elementu reagującego na auksyny, pochodzącego z promotora genu *GH3* soi, [44]. Ten system

reporterowy jest szeroko stosowanym narzędziem w biologii roślin do wizualizacji wzorców odpowiedzi na auksyny. Po otrzymaniu nasion przeprowadziłem eksperyment na 14-dniowych siewkach, testując odpowiedź roślin na auksyny poprzez zastosowanie kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Wyniki pokazały, że mutanty *mta* wykazywały znacznie mniejszą ekspresję GUS, co wskazuje na zmniejszoną odpowiedź na auksynę. Biorąc pod uwagę rolę miR393b w regulacji odpowiedzi na auksyny i jego obniżony poziom u mutantów *mta*, sprawdziliśmy jego zależność od znacznika m6A. W naszych eksperymentach m6A-IP-seq nie mogłem wykryć prekursora pri-miR393b, ale Susheel Sagar Bhat potwierdził jego metylację oraz wiązanie się do białka MTA przy użyciu odpowiednio m6A-IP RT-qPCR oraz immunoprecypitacji. Analiza PIP-seq wykazała, że pri-miR393b ma zmienioną strukturę drugorzędową w mutantach *mta* w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Model struktury drugorzędowej wykazał, że rejon typu spinki do włosów zawierający dojrzały miR393b tworzy się wydajniej, gdy pri-miR393b posiada znacznik m6A. W celu sprawdzenia czy niski poziom ekspresji miR393b jest spowodowany brakiem białka MTA, zaprojektowałem eksperyment polegający na wykorzystaniu przejściowej ekspresji w roślinach *Nicotiana benthamiana*. Wektory posiadające sekwencje pri-miR393b, MTA lub katalitycznie nieaktywną wersję MTA (Δ MTA) wprowadziłem do liści *Nicotiana*. Wektory te zostały przygotowane przez Natalię Grzelak podczas jej pracy magisterskiej pod moim kierunkiem. Analiza Northern blot wykazała, że koekspresja pri-miR393b z MTA powodowała około ~2,3 razy wyższy poziom dojrzałego miR393b, efekt w dużej mierze zniesiony przy użyciu nieaktywnego Δ MTA. Zatem zmniejszona odpowiedź auksynowa u roślin mutantów *mta* jest częściowo spowodowana upośledzoną biogenezą miR393b wynikającą z braku aktywności białka MTA.

Podsumowując, moi koledzy i ja wykazaliśmy, że brak znacznika m6A wpływa na biogenezę co najmniej 25% miRNA *Arabidopsis thaliana*. Metylacja m6A roślinnych pri-miRNA przez MTA jest kluczowa, ponieważ jej niedobór prowadzi do akumulacji pri-miRNA i w efekcie obniżonego poziomu dojrzałych cząsteczek miRNA. MTA oddziałuje z polimerazą RNA II i białkiem TOUGH (TGH), co wskazuje na jego rolę we wczesnych etapach biogenezy miRNA. Brak znacznika m6A w rejonie typu spinki do włosów pri-miRNA wpływa na strukturę drugorzędową pri-miRNA, utrudniając wiązanie się białka Hyponastic Leaves 1 (HYL1) do pri-miRNA. Odkrycia te sugerują, że białko MTA wpływa na tworzenie się kompleksu Mikroprocesora poprzez metylowanie prekursorów miRNA i bezpośrednie oddziaływanie z TGH. W konsekwencji, rośliny mutantów *mta*

charakteryzują się niewydajnym dojrzewaniem pri-miRNA do miRNA, w tym obniżonym poziomem miR393b, co częściowo upośledza odpowiedź tych roślin na auksyny.

3. Białka tworzące kompleks Mikroprocesora są niezbędne do prawidłowego rozwoju roślin - artykuł przeglądowy (**publikacja 3**)

W tym artykule przeglądowym moi współpracownicy i ja (autor korespondencyjny) kompleksowo podsumowaliśmy aktualną literaturę na temat kompleksu Mikroprocesora i jego podstawowych białek (DCL1, SE i HYL1), koncentrując się na tym, jak ich regulacja wpływa na rozwój roślin. Dodatkowo przedstawiamy kilka oryginalnych analiz istniejących danych. W szczególności wykonane zostało modelowanie struktury HYL1 zawierającej fosforylowaną serynę 42 (Ser42). Pokazaliśmy, że ta fosforylacja może hamować wiązanie HYL1 z cząsteczkami RNA. Analiza ta została wykorzystana we wspomnianej publikacji 1 do postawienia hipotezy, że stan fosforylacji HYL1 może determinować jego podwójną rolę: zaangażowanie w transkrypcję lub dojrzewanie pri-miRNA, co zostało poparte wynikami przeprowadzonych eksperymentów. Co więcej, w tym artykule przeglądowym, analizując dane literaturowe, przestawiamy w przystępny sposób skomplikowaną regulację kompleksu Mikroprocesora i jego znaczenie w biologii roślin. W artykule podkreślamy znaczenie modyfikacji potranslacyjnych, takich jak fosforylacja, w modulowaniu funkcji głównych składników Mikroprocesora. Zrozumienie tych mechanizmów regulacyjnych ma kluczowe znaczenie dla pełnego poznaniu szlaku biogenezy miRNA i jego wpływu na rozwój roślin i odpowiedzi roślin na stres. Ponadto omawiamy potencjalne przyszłe kierunki badań, w tym badanie dodatkowych modyfikacji potranslacyjnych i ich wpływu na kompleks Mikroprocesora. Sugerujemy również zbadanie oddziaływania między głównymi komponentami a innymi białkami zaangażowanymi w dojrzewanie RNA, aby uzyskać bardziej kompleksowe zrozumienie procesu dojrzewania miRNA.

Podsumowując, nasz artykuł przeglądowy nie tylko konsoliduje istniejącą wiedzę, ale także zapewnia nowe perspektywy i hipotezy, które mogą być przetestowane w przyszłych badaniach w dziedzinie biologii molekularnej roślin.

4. Białko PRP40 reguluje kotranskrypcyjne dojrzewanie pri-miRNA *Arabidopsis thaliana* (**publikacja 4**)

W tym artykule wykazaliśmy, że mikroRNA odgrywają kluczową rolę w regulacji genów roślinnych, a ich biogeneza opiera się na kotranskrypcyjnym dojrzewaniu transkryptów

pierwotnych pri-miRNA generowanych przez polimerazę RNA II. Wiadomo było, że dojrzewanie pri-miRNA jest koordynowane przez kompleks wielu białek znanych jako Mikroprocesor. Jednak w tym artykule wykazaliśmy, że również białko PRE-MRNA PROCESSING PROTEIN 40 (PRP40) *Arabidopsis thaliana* jest zaangażowane w szlak biogenezy miRNA. Białko PRP40, zostało zidentyfikowane jako pozytywny regulator w rekrutacji SERRATE, głównego składnika roślinnego Mikroprocesora, do genów *MIR*. Wykazaliśmy, że oddziaływanie białka DCL1 (endorybonukleazy) z chromatyną jest zaburzone u roślin posiadających obniżoną ekspresję białka PRP40 (mutant *prp40ab*). To zaburzenie prowadzi następnie do upośledzonego kotranskrypcyjnego tworzenia się kompleksu Mikroprocesora, co skutkuje akumulacją polimerazy RNA II na genach *MIR* i zatrzymaniem transkrypcji tych genów w mutancie *prp40ab*.

Białko PRP40 jest ważne dla rozwoju Arabidopsis thaliana

Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera trzy paralogi genu *PRP40*, wykazujące zróżnicowaną ekspresję w różnych tkankach i stadiach rozwojowych [45]. *PRP40A* wykazuje wysoką ekspresję, podczas gdy *PRP40C* wykazuje minimalną ekspresję. Wcześniejsze badania (jestem współautorem tego artykułu) podkreśliły rolę jaką pełnią białka PRP40a i PRP40b w szlaku biogenezy miRNA oraz splicingu prekursorów miRNA [46]. Warto podkreślić obserwacje, że współczynnik kolokalizacji białka PRP40b z kompleksem U1 snRNP jest stosunkowo niski, co sugerowało dodatkowe funkcje jakie może pełnić PRP40b poza kompleksem U1 snRNP. Mutanty *Arabidopsis thaliana* pozbawione ekspresji jednego tylko genu *PRP40* są podobne do roślin typu dzikiego, ale podwójny mutant *prp40a prp40b* (zwany dalej *prp40ab*) wykazuje opóźniony wzrost. Dodatkowo, pojedyncze mutanty *prp40b* i *prp40a* wykazują podwyższony poziom mRNA odpowiednio genów *PRP40A* i *PRP40B*. Nie udało się uzyskać potrójnego mutantu *prp40a prp40b prp40c*, prawdopodobnie ze względu na bliskie sąsiedztwo na chromosomie genów *PRP40B* i *PRP40C*. Oddziaływanie między białkiem SERRATE (SE) i PRP40a/PRP40b jest kluczowe dla rozwoju roślin, ponieważ mutacja w genie *SE* w połączeniu z inaktywacją *PRP40A* i *PRP40B* prowadzi do nieprawidłowego rozwoju zarodków *Arabidopsis thaliana*. Jednak skrzyżowanie mutantu *prp40ab* z *hyl1-2*, mutantem często wykorzystywanym w moich badaniach, częściowo przywraca mutantom fenotyp roślin typu dzikiego, wskazując na złożone sieci wzajemnych powiązań genetycznych w szlakach dojrzewania miRNA.

Białko PRP40 pośredniczy w oddziaływaniu pomiędzy SE z polimerazą RNA II i genami MIR.

Analizy kolokalizacji i eksperymenty PLA wykazały, że białko PRP40b znajduje się w pobliżu białka SE w jądrze komórkowym. Wiązanie pomiędzy białkiem SE i ufosforylowanymi izoformami polimerazy RNA II było znacznie obniżone w mutantach *prp40ab* w porównaniu z roślinami typu dzikiego, co sugeruje, że białko PRP40 ułatwia to oddziaływanie. Jednak oddziaływanie między PRP40b i polimerazą RNA II nie ulega zmianie w mutantach *se-2*, co wskazuje, że białko SE nie jest wymagane do oddziaływania PRP40b-polimeraza RNA II. Testy *in vitro* typu „pull-down” wykazały, że białko SE tworzy kompleks z domeną CTD polimerazy RNA II tylko w obecności białka PRP40b, a nie bezpośrednio. Tworzenie kompleksu nie zachodziło w przypadku zastosowania skróconego wariantu białka SE pozbawionego C-końcowych aminokwasów. Dodatkowo, eksperymenty ChIP (immunoprecypitacja z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających białko SE) wykazały zmniejszoną rekrutację białka SE do genów *MIR* w mutantach *prp40ab*. Odkrycia te sugerują, że białko PRP40 odgrywa kluczową rolę w rekrutacji SE do polimerazy RNA II i genów *MIR*, podkreślając rolę białka PRP40 w regulacji biogenezy miRNA.

Białko PRP40 jest zaangażowane w transkrypcję pri-miRNA

Aby zbadać rolę PRP40 w dojrzewaniu pri-miRNA, wykorzystaliśmy wspomnianą wcześniej platformę mirEX 2.0 do analizy poziomów 297 pri-miRNA *Arabidopsis thaliana* [37, 47]. Stwierdziliśmy, że 46% wykrytych pri-miRNA wykazywało znaczące zmiany w mutancie *prp40ab* w porównaniu z roślinami typu dzikiego, przy czym większość (71%) wykazywała obniżony poziom pri-miRNA w mutantach. Redukcja poliadenylowanych pri-miRNA była specyficzna dla mutantów podwójnych *prp40ab* i nie występowała u pojedynczych mutantów genów *PRP40*. Testy stabilności mRNA (testy wykorzystujące kordycepinę) wykazały, że obniżony poziom prekursorów pri-miRNA nie były spowodowane zmienioną stabilnością poliadenylowanych pri-miRNA. Co zaskakujące, wysokoprzepustowe sekwencjonowanie puli małych RNA ujawniło, że poziom większości dojrzałych miRNA pozostały niezmienione lub nieznacznie wzrosły w mutantach *prp40ab* w porównaniu do roślin typu dzikiego, szczególnie tych miRNA obecnych w dużych ilościach. Co więcej, precyzja cięcia miRNA pozostała niezmieniona. Dodatkowo, poziom pri-miRNA zmierzony za pomocą RT-qPCR, ale wykorzystujące do reakcji odwrotnej transkrypcji szóstkowe losowe startery (a nie oligo(dT) jak w przypadku

platformy mirEX 2.0), nie uległy zmianie w roślinach *prp40ab*. Dalsze analizy wykluczyły również zmiany w poziomie ekspresji białek DCL1 lub SE jako przyczyny obserwowanych efektów u mutantów *prp40ab*, chociaż zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji białka HYL1 w roślinach *prp40ab*. Ogólnie rzecz biorąc, wyniki te sugerują, że podczas gdy białka PRP40a i PRP40b są kluczowymi białkami niezbędnymi do utrzymania prawidłowego poziomu poliadenylowanych pri-miRNA, ich brak ma niewielki wpływ na produkcję dojrzałych miRNA.

PRP40 wpływa na chromatynową dystrybucję polimerazy RNA II oraz DCL DCL1 na genach MIR

Zastanawialiśmy się, czy obserwowana rozbieżność w mutancie *prp40ab* pomiędzy poziomami poliadenylowanymi pri-miRNA a całkowitą ilością transkryptu genów *MIR* (mierzoną z wykorzystaniem do RT szóstkowych losowych starterów) może wynikać z niewłaściwej terminacji transkrypcji lub zmian w dojrzewaniu prekursorów pri-miRNA. Za pomocą metody CHIP-seq sprawdziliśmy, jak wygląda chromatynowa dystrybucja polimerazy RNA II w mutancie *prp40ab* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Zaobserwowaliśmy akumulację polimerazy RNA II na genach *MIR* w mutancie *prp40ab*, szczególnie na rejonach genowych zawierających sekwencje pre-miRNA oraz na końcach 3' genu, co korelowało ze zmniejszonymi poziomami poliadenylowanych pri-miRNA. Zaobserwowaliśmy również akumulację polimerazy RNA II wzdłuż genów kodujących białka, ale nie przekładało się to na zmiany poziomu poliadenylowanych transkryptów tych genów. W celu ustalenia, czy białko PRP40 bezpośrednio wpływa na inicjację transkrypcji, przetestowaliśmy aktywność promotorów genów *MIR* w protoplastach, uzyskanych z mutantów *prp40ab* i roślin typu dzikiego, przy użyciu testu lucyferazy. W analizie nie stwierdziliśmy znaczących różnic w aktywności promotorów genów *MIR*. Sugeruje to, że białka PRP40a i PRP40b nie są zaangażowane w inicjację transkrypcji genów *MIR*. Zbadaliśmy również akumulację białka DCL1 na chromatynie i stwierdziliśmy, że jest ona zmieniona u mutantów *prp40ab* w porównaniu do roślin typu dzikiego, ze zwiększoną akumulacją białka DCL1 na genach *MIR*, których dojrzewanie pri-miRNA przebiega w schemacie LTB (ang. *Loop-to-Base*), ale nie na genach *MIR*, których dojrzewanie pri-miRNA przebiega w schemacie BTL (ang. *Base-to-Loop*) [48]. LTB i BTL odnoszą się do różnych mechanizmów dojrzewania pri-miRNA, a konkretnie do sposobu, w jaki kompleks Mikroprocesora rozcina strukturę typu spinki do włosów pri-miRNA w celu wytworzenia dojrzałych miRNA. W schemacie LTB, początkowe cięcie jest wykonywane w pętli

końcowej, po którym następuje drugie cięcie w kierunku podstawy spinki do włosów, a oba etapy cięcia zwykle zachodzą kotranskrypcyjnie. W schemacie BTL kompleks Mikroprocesora najpierw dokonuje cięcia pri-miRNA w pobliżu podstawy struktury spinki do włosów, cięcie odbywa się potranskrypcyjnie, co oznacza, że następuje po zakończeniu transkrypcji pri-miRNA i uwolnieniu transkryptu do nukleoplazmy. Nasze dane z ChIP-seq (wykonane dla polimerazy RNA II oraz DCL1) wyraźnie wskazują, że białka PRP40 regulują kotranskrypcyjną ekspresję genów *MIR*. W celu sprawdzenia tej hipotezy, zmierzaliśmy poziomy prekursorów pri-miRNA we frakcjach nukleoplazmatycznych i chromatynowych. Zgodnie z oczekiwaniami, wyniki wykazały zwiększoną asocjację prekursorów pri-miRNA typu LTB we frakcji chromatynowej w roślinach *prp40ab* w porównaniu do roślin typu dzikiego.

Podsumowując, wyniki tych badań podkreślają znaczenie białka PRP40 w prawidłowym kotranskrypcyjnym tworzeniu kompleksu Mikroprocesora, zapewniając wydajne dojrzewanie prekursorów pri-miRNA do mikroRNA. Co więcej, badania te poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmu dojrzewania pri-miRNA, zapewniając podstawę do dalszych badań nad złożonymi mechanizmami regulującymi ekspresję genów w roślinach.

5. Prezentacja znaczącej działalności naukowej lub artystycznej prowadzonej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub kulturalnej, w szczególności w instytucjach zagranicznych.
 - **6-miesięczny** pobyt na Uniwersytecie w Bazylei (grupa Franck'a Vazquez'a) - praca została opublikowana w czasopiśmie PLoS One - doi:10.1371/journal.pone.0095972
 - **11-miesięczny** pobyt na Uniwersytecie Bielefeld (grupa Dorothee Staiger) - wyniki nie zostały jeszcze opublikowane.
 - **1-miesięczny** pobyt w Umea Plant Science Center (grupa Peter'a Kindgren'a) - praca obecnie zdeponowana w BioRxive - doi:10.1101/2023.05.10.540235
 - **3-miesięczny** pobyt na Uniwersytecie w Perpignan (grupa Cecile Bousquet-Antonelli) - praca jest kontynuowana w ramach **12-miesięcznego** stypendium Mieczysława Bekkera z instytucji NAWA - rozpoczęcie stypendium lipiec 2024 instytucja goszcząca: Instytut Biologii Molekularnej Roślin (IBMP) w Strasburgu.

6. Prezentacja osiągnięć dydaktycznych i organizacyjnych oraz osiągnięć w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki.

a) Nadzór nad studentami studiów magisterskich i podyplomowych:

Obecnie opiekuję się jednym studentem studiów magisterskich, a także doktorantem i pracownikiem podoktorskim pracującymi nad projektem grantowym OPUS, którego jestem kierownikiem, z Narodowego Centrum Nauki w Polsce).

Wcześniej byłem promotorem dwóch prac magisterskich, które zostały obronione w 2019 roku, a także współpromotorem pracy doktorskiej Susheel Sagar Bhat, która została obroniona w 2020 roku.

b) Nauczanie

1. Od 2017 roku jestem zaangażowany w prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Biologii UAM. Prowadziłem kilka kursów, w tym Biochemię, Regulację Procesów Komórkowych, Genetykę Molekularną.

2. W 2021 roku zorganizowałem kurs dla doktorantów zatytułowany "Podstawy analizy danych sekwencjonowania NGS".

3. Od roku akademickiego 2023/2024 jestem koordynatorem dwóch kursów na Wydziale Biologii:

1. Techniki analizy kwasów nukleinowych i białek.

2. Wykorzystanie organizmów zmodyfikowanych genetycznie do celów produkcyjnych.

4. W roku akademickim 2022/2023 uczestniczyłem w pracach komisji zajmującej się opracowaniem nowego programu dla studentów biotechnologii. Nasza praca została doceniona nagrodą zespołową Rektora UAM.

c) Popularyzacja nauki:

1. Zaprojektowałem i prowadziłem dwa kursy dla uczniów szkół średnich. Jeden z nich był częścią corocznych "Dni Akademickich" organizowanych przez Wydział Biologii UAM. Drugi przygotowywał uczniów szkół średnich do ogólnopolskiej olimpiady biologicznej, wprowadzając ich w różne podstawowe techniki biologii molekularnej.

2. Zorganizowałem interaktywny pokaz naukowy dla dzieci w wieku przedszkolnym w Kościanie, pobudzając ich ciekawość praktycznymi eksperymentami.

3. W moim rodzinnym mieście w Krzywiniu prowadziłem wykłady i pokazy naukowe dla uczniów szkół średnich, czyniąc złożone idee zrozumiałymi i interesującymi.
-
7. Inne informacje o mojej karierze zawodowej, które uważam za ważne.
 1. Zabezpieczone finansowanie
 - 2017-2022: Kierownik grantu Sonata Narodowego Centrum Nauki w Polsce.
 - 2023: Otrzymałem grant OPUS z Narodowego Centrum Nauki w Polsce, zabezpieczający finansowanie mojego laboratorium w Centrum Zaawansowanych Technologii do 2027 roku.
 - 2023: Złożono wniosek o grant Sonata Bis.
 2. Stypendia i nagrody
 - 2016: Przyznane 3-letnie stypendium Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców.
 - 2023: Otrzymałem indywidualną nagrodę Rektora UAM za osiągnięcia naukowe.
 - 2024: Otrzymał roczne stypendium od Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) na prowadzenie badań w Instytucie Biologii Molekularnej Roślin w Strasburgu.
 3. Dodatkowe działania
 - Od 2022 r.: jestem przedstawicielem konsorcjum RNA Research Center (współpraca Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM oraz Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN) w RNA Collaborative Seminars, będących częścią działalności RNA Society.
 - 2021: Ukończyłem roczne studia podyplomowe na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, które podniosły moje kwalifikacje i umożliwiły mi zostanie koordynatorem kursu prowadzonego na Wydziale Biologii UAM pt. „Wykorzystanie organizmów zmodyfikowanych genetycznie do celów produkcyjnych.”

.....
(podpis wnioskodawcy)

Bibliografia

1. Dhir, A. and N.J. Proudfoot, *Feed backwards model for microRNA processing and splicing in plants*. EMBO Rep, 2013. **14**(7): p. 581-2.
2. Kurihara, Y., *A New Role of HYL1 in Transcriptional Regulation of Both MicroRNA- and Protein-Coding Genes*. Plant Cell Physiol, 2023. **64**(6): p. 565-566.
3. Vazquez, F., *Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways*. Trends Plant Sci, 2006. **11**(9): p. 460-8.
4. Voinnet, O., *Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 669-87.
5. Wierzbicki, A.T., J.R. Haag, and C.S. Pikaard, *Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes*. Cell, 2008. **135**(4): p. 635-48.
6. Kruszka, K., et al., *Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments*. J Plant Physiol, 2012. **169**(16): p. 1664-72.
7. Chen, X., *A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2022-5.
8. Palatnik, J.F., et al., *Control of leaf morphogenesis by microRNAs*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 257-63.
9. Barciszewska-Pacak, M., et al., *Arabidopsis microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses*. Front Plant Sci, 2015. **6**: p. 410.
10. Xie, Z., et al., *Expression of Arabidopsis MIRNA genes*. Plant Physiol, 2005. **138**(4): p. 2145-54.
11. Hajheidari, M., C. Koncz, and D. Eick, *Emerging roles for RNA polymerase II CTD in Arabidopsis*. Trends Plant Sci, 2013. **18**(11): p. 633-43.
12. Hajheidari, M., et al., *CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II*. Plant Cell, 2012. **24**(4): p. 1626-42.
13. Kurihara, Y. and Y. Watanabe, *Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12753-8.
14. Dolata, J., et al., *Regulation of Plant Microprocessor Function in Shaping microRNA Landscape*. Front Plant Sci, 2018. **9**: p. 753.
15. Yang, S.W., et al., *Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing*. Structure, 2010. **18**(5): p. 594-605.
16. Burdisso, P., et al., *Structural determinants of Arabidopsis thaliana Hyponastic leaves 1 function in vivo*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113243.
17. Yang, X., et al., *Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(19): p. 12224-36.
18. Vazquez, F., et al., *The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing*. Curr Biol, 2004. **14**(4): p. 346-51.
19. Lu, C. and N. Fedoroff, *A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin*. Plant Cell, 2000. **12**(12): p. 2351-2366.
20. Manavella, P.A., et al., *Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1*. Cell, 2012. **151**(4): p. 859-70.
21. Su, C., et al., *The Protein Phosphatase 4 and SMEK1 Complex Dephosphorylates HYL1 to Promote miRNA Biogenesis by Antagonizing the MAPK Cascade in Arabidopsis*. Dev Cell, 2017. **41**(5): p. 527-539 e5.
22. Raghuram, B., et al., *MicroRNA biogenesis factor DRB1 is a phosphorylation target of mitogen activated protein kinase MPK3 in both rice and Arabidopsis*. FEBS J, 2015. **282**(3): p. 521-36.

23. Yan, J., et al., *The SnRK2 kinases modulate miRNA accumulation in Arabidopsis*. PLoS Genet, 2017. **13**(4): p. e1006753.
24. Achkar, N.P., et al., *A Quick HYL1-Dependent Reactivation of MicroRNA Production Is Required for a Proper Developmental Response after Extended Periods of Light Deprivation*. Developmental Cell, 2018. **46**(2): p. 236-247.e6.
25. Szarzynska, B., et al., *Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(9): p. 3083-93.
26. Sapra, A.K., et al., *SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo*. Mol Cell, 2009. **34**(2): p. 179-90.
27. Vidal, E.A., et al., *Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4477-82.
28. Tagami, Y., H. Motose, and Y. Watanabe, *A dominant mutation in DCL1 suppresses the hyl1 mutant phenotype by promoting the processing of miRNA*. RNA, 2009. **15**(3): p. 450-8.
29. Zhu, Z., et al., *Arabidopsis resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(31): p. 13960-5.
30. Stepien, A., et al., *Chromatin-associated microprocessor assembly is regulated by the U1 snRNP auxiliary protein PRP40*. Plant Cell, 2022. **34**(12): p. 4920-4935.
31. Fang, X., et al., *Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis*. Nat Plants, 2015. **1**: p. 15075.
32. Speth, C., et al., *Arabidopsis RNA processing factor SERRATE regulates the transcription of intronless genes*. Elife, 2018. **7**.
33. Yang, Y., et al., *Dynamic transcriptomic m(6)A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism*. Cell Res, 2018. **28**(6): p. 616-624.
34. Bhat, S.S., et al., *N⁶-methyladenosine (m⁶A): Revisiting the Old with Focus on New, an Arabidopsis thaliana Centered Review*. Genes (Basel), 2018. **9**(12).
35. Zhong, S., et al., *MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor*. Plant Cell, 2008. **20**(5): p. 1278-88.
36. Bielewicz, D., et al., *mirEX: a platform for comparative exploration of plant pri-miRNA expression data*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**(D1): p. D191-D197.
37. Zielezinski, A., et al., *mirEX 2.0 - an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs*. BMC Plant Biol, 2015. **15**: p. 144.
38. Liu, N., et al., *N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 560-4.
39. Ke, S., et al., *m(6)A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover*. Genes Dev, 2017. **31**(10): p. 990-1006.
40. Kasowitz, S.D., et al., *Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development*. PLoS Genet, 2018. **14**(5): p. e1007412.
41. Slobodin, B., et al., *Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation*. Cell, 2017. **169**(2): p. 326-337 e12.
42. Ren, G., et al., *Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12817-21.
43. Ruzicka, K., et al., *Identification of factors required for m(6) A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI*. New Phytol, 2017. **215**(1): p. 157-172.
44. Ulmasov, T., et al., *Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements*. Plant Cell, 1997. **9**(11): p. 1963-71.
45. Wang, B.B. and V. Brendel, *The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing*. Genome Biol, 2004. **5**(12): p. R102.
46. Knop, K., et al., *Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of Arabidopsis microRNAs derived from intron-containing genes*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(5): p. 2757-2775.

47. Bielewicz, D., et al., *mirEX: a platform for comparative exploration of plant pri-miRNA expression data*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D191-7.
48. Bologna, N.G., et al., *A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159*. EMBO J, 2009. **28**(23): p. 3646-56.