

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Zakład Ekspresji Genów

Rozprawa doktorska

**Analiza zależności między maszyną biogenezy mikroRNA  
a spliceosomem u roślin**

**Agata Stępień**

**Praca napisana pod kierunkiem  
Prof. dr. hab. Przemysława Wojtaszka**

**Poznań, 2016**

## **Składam serdeczne podziękowania**

**Panu prof. dr hab.**

**Arturowi Jarmołowskiemu**

za intelektualne inspiracje i twórcze  
rozwinięcie moich zainteresowań  
naukowych oraz umiejętności.

**Panu prof. dr hab.**

**Przemysławowi Wojtaszkowi**

za wiedzę, jaką przekazał mi  
w okresie studiów doktoranckich  
oraz wsparcie.

**Pani prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej**

za konstruktywne dyskusje, zaangażowanie oraz wszelką pomoc.

Dziękuję również **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Ekspresji Genów** za wspaniałą  
atmosferę pracy, nieustanną inspirację, nieocenioną pomoc oraz wielką serdeczność.

## **FINANSOWANIE**

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

1. Narodowego Centrum Nauki (grant 2012/05/N/NZ2/00880 dla A.S.)
2. Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (stypendium w ramach subsydium Mistrz 3./2014, Laureat: Prof. dr hab. Artur Jarmołowski)
3. KNOW Poznańskie Konsorcjum RNA (01/KNOW2/2014).
4. Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (grant GDWB-02/2013, dla A.S.)

Autor uzyskał środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer UMO-2015/16/T/NZ1/00026.

## PUBLIKACJE

Wyniki badań zostały przedstawione w artykułach:

1. Knop K.\*, Stępień A.\*, Barciszewska-Pacak M., Taube M., Bielewicz D., Michalak M., Borst JW., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2016. Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of Arabidopsis microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkw895.
2. Raczyńska K.D., Stępień A., Kierzkowski D., Kalak M., Bajczyk M., McNicol J., Simpson C.G., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J.W., Jarmołowski A. 2014. The SERRATE protein is involved in alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* 42(2): 1224-1244.

Ponadto opublikowano następujące prace dotyczące biogenezy i działania miRNA:

1. Stępień A.\*, Knop K.\*, Dolata J.\*, Taube M., Bajczyk M., Barciszewska-Pacak M., Pacak A., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2016. Post-transcriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *WIREs RNA*, doi: 10.1002/wrna.1403
2. Zieleziński A\*., Dolata J.\*, Alaba S.\*, Kruszka K.\*, Pacak A.\*, Świda-Barteczka A., Skorupa K., Stępień A., Bielewicz D., Pietrykowska H., Sierocka I., Sobkowiak Ł., Lakomiak A., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z., Karłowski W. 2015. mirEX 2.0 - an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs. *BMC Plant Biol* 15:144.

\* autorzy równorzędni

## Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW .....	6
STRESZCZENIE .....	8
<b>1. WSTĘP.....</b>	<b>12</b>
1.1. BIOGENEZA ROŚLINNYCH miRNA .....	12
1.1.1. <i>Struktura i transkrypcja roślinnych genów miRNA (MIR)</i> .....	13
1.1.2. <i>Dojrzewanie pierwotnych prekursorów miRNA</i> .....	15
1.2. FUNKCJONOWANIE miRNA W CYTOPLAZMIE .....	22
1.3. ZWIĄZEK BIOGENEZY miRNA Z INNYMI PROCESAMI METABOLIZMU RNA .....	23
1.4. SPLICING U ROŚLIN.....	26
1.5. CHARAKTERYSTYKA KOMPLEKSU snRNP U1.....	29
<b>2. CEL PRACY.....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIAŁY .....</b>	<b>36</b>
3.1. MATERIAŁ ROŚLINNY .....	36
3.2. OLIGONUKLEOTYDY .....	37
3.3. WEKTORY.....	40
3.4. ODCZYNNIKI I ROZTWORY .....	43
3.5. PODSTAWOWE MATERIAŁY DO HODOWLI BAKTERII.....	46
3.6. MATERIAŁY DO HODOWLI ROŚLIN .....	46
3.7. MATERIAŁY DO ANALIZ BIAŁKOWYCH .....	47
3.8. IZOLACJA I TRANSFEKCJA PROTOPLASTÓW <i>A. THALIANA</i> .....	50
3.9. MATERIAŁY DO ANALIZ Z WYKORZYSTANIEM DROŻDŻY .....	51
<b>4. METODY.....</b>	<b>55</b>
4.1. HODOWLA ROŚLIN .....	55
4.2. EKSPERYMENTY Z WYKORZYSTANIEM KWASÓW NUKLEINOWYCH .....	55
4.3. EKSPERYMENTY Z WYKORZYSTANIEM BIAŁEK .....	60
4.4. IZOLACJA I TRANSFEKCJA PROTOPLASTÓW <i>A. THALIANA</i> .....	63
4.5. MIKROSKOPIA KONFOKALNA.....	64
4.6. ANALIZY FRET-FLIM .....	64
4.7. KOMBINACJA TECHNIK MIKROSKOPOWYCH BiFC I FRET-FLIM .....	65
4.8. DWUBYDROWY SYSTEM DROŻDŻOWY.....	65
<b>5. WYNIKI.....</b>	<b>67</b>
5.1. CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWANIA SERRATE Z ROŚLINNYM KOMPLEKSEM WIĄŻĄCYM CZAPECZKĘ (ATCBC).....	67
5.2. IDENTYFIKACJA BIAŁKA/BIAŁEK snRNP U1, KTÓRE ODDZIALUJĄ Z SERRATE .....	75
5.3. CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWAŃ SE/SnRNP U1 .....	85
5.4. ROLA ODDZIAŁYWAŃ SE/SnRNP U1 W BIOGENEZIE miRNA .....	99
<b>6. DYSKUSJA.....</b>	<b>112</b>
6.1. KOMPLEKS SERRATE/ATCBC .....	112
6.2. KOMPLEKS SERRATE/SnRNP U1.....	115
6.3. SERRATE, PLATFORMĄ DLA ODDZIAŁYWAŃ BIAŁEK ZAANGAŻOWANYCH W BIOGENEZĘ miRNA 120	
<b>7. PODSUMOWANIE .....</b>	<b>128</b>
WYKAZ RYCIN I TABEL.....	129
LITERATURA .....	133

## WYKAZ SKRÓTÓW

A	adenina
aa	aminokwas (y)
AD	domena aktywująca czynnika transkrypcyjnego Gal4
AGO	ARGONAUT
APS	nadsiarczan amonu
ARS2	ARSENIC RESISTANCE PROTEIN 2
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BD	domena wiążąca DNA czynnika transkrypcyjnego Gal4
BiFC	BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION
CBP	białko wiążące czapeczkę
CBC	kompleks wiążący czapeczkę
Cer	białko fluorescencyjne Cerulean
COP1	CONSTANS PHOTOMORPHOGENIC 1
CPL1	C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1
CTD	C-terminalna domena RNA polimerazy II
DDL	DAWDLE
DCL1	DICER-LIKE 1 (endorybonukleaza typu III)
DGCR8	DiGeorge SYNDROME CRITICAL REGION 8
DRB	białko wiążące dwuniciowy RNA
dsRBD	domena wiążąca dwuniciowy RNA
DTT	ditiotretitol
EDTA	ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID
EGTA	ETHYLENE GLYCOL TETRAACETIC ACID
EYFP	ENHANCED YELLOW FLUORESCENT PROTEIN
FRET - FLIM	FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER by FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING
gDNA	genomowy DNA
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GRP7	GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7
H	histydyna
HEN1	HUA ENHANCER 1 (metyltransferaza)

HESO1	HEN1 SUPPRESOR1
HST	HASTY (eksportyna)
HYL1	HYPONASTIC LEAVES 1
L	leucyna
MBP	białko wiążące maltose
<i>MIR</i>	gen kodujący miRNA
miRNA	cząsteczka mikroRNA
MOS2	MODIFIER OF SNC2
PRL1	PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS1
PRP	pre-mRNA PROCESSING PROTEIN
RACK1	RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE
RBM7	RNA-BINDING PROTEIN 7
RNA Pol II	DNA-zależna polimeraza RNA II
RISC	kompleks efektorowy RNAi (RNA-induced silencing complex)
RRM	domena wiążąca RNA
SDS	dodecylosiarczan sodu
SE	SERRATE
SIC	SICKLE
siRNA	cząsteczka krótkiego interferującego RNA
snRNA	cząsteczka krótkiego jądrowego RNA
snRNP	kompleks rybonukleoproteinowy (SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLE)
SR	białko bogate w serynę i argininę
STA1	STABILIZED 1
T	tryptofan
tRFP	tag RED FLUORESCENT PROTEIN
ta-siRNA	TRANS-ACTING SMALL INTERFERING RNA
TEMED	N,N,N',N'-TETRAMETHYLETHYLENEDIAMINE
TGH	TOUGH
TRBP	TAR RNA-BINDING PROTEIN
UTR	region RNA niepodlegający translacji

## STRESZCZENIE

**Wstęp:** Procesy odpowiedzialne za regulację ekspresji genów warunkują życie i są szczególnie istotne w zmieniających się warunkach środowiska. Kluczowym elementem tej sieci regulacyjnej są mikroRNA (miRNA). Te krótkie jednoniciowe fragmenty RNA regulują poziom białek poprzez cięcie docelowych mRNA bądź hamowanie ich translacji. Biogeneza miRNA u roślin jest bardzo skomplikowanym i wciąż nie do końca poznany procesem, zachodzącym na terenie jądra komórkowego. Geny miRNA u roślin tworzą najczęściej niezależne jednostki transkrypcyjne i są przepisywane na długie niekodujące transkrypty, które zawierają miRNA zarówno w intronach, jak i egzonach takich prekursorów (pri-miRNA). Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na niezwykle istotną zależność wydajności biogenezy miRNA od wycinania intronów znajdujących się w ich prekursorach. Nie scharakteryzowano jednak do tej pory elementów komórkowych odpowiedzialnych za tą regulację.

**Cel pracy:** Celem pracy była identyfikacja białek odpowiedzialnych za powiązanie maszynarii biogenezy miRNA i splicingowej oraz charakterystyka tych oddziaływań.

**Wyniki:** Wykazano bezpośrednie oddziaływanie między SERRATE (SE), jednym z głównych białek maszynarii biogenezy miRNA, i obydwoma podjednostkami jądrowego kompleksu wiążącego czapczkę (AtCBC, ang. *cap binding complex*). Zaobserwowano tworzenie się potrójnego kompleksu składającego się z SE, AtCBP80 i AtCBP20 oraz stabilizację oddziaływań między jego komponentami w porównaniu z indywidualnymi oddziaływaniami SE-AtCBP20 i SE-AtCBP80. Ustrukturyzowany centralny rdzeń SE okazał się być wystarczającym fragmentem białka do budowania kompleksu z AtCBP20 i 80. Kompleks ten stanowi podstawę molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za rolę SE i AtCBC w regulacji splicingu pre-mRNA i biogenezy miRNA.

Zidentyfikowano również bezpośrednie oddziaływania między SE i czterema pomocniczymi białkami kompleksu snRNP U1, tj. AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl. W oddziaływania te zaangażowane są nieustrukturyzowane końce SE, które okazały się być wystarczającą częścią białka do związania trzech (AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl) z czterech białek pomocniczych snRNP U1. Związanie AtPRP39b wymaga prawdopodobnie obecności innych fragmentów SE. W linii *A. thaliana se-2*, w której obecna wersja SE pozbawiona jest zdolności do kontaktu z białkami snRNP U1,

odnotowano zmiany splicingu i wydajności biogenezy miR1888a w stosunku do roślin z aktywnym połączeniem SE-snRNP U1. Ponadto, wykazana nieobecność SE i pomocniczych białek snRNP U1 w ciałach Cajala potwierdza brak bezpośredniego powiązania między tymi strukturami i dojrzewaniem prekursorów miRNA, zależnym od wspomnianych białek.

Wyniki niniejszej pracy pozwoliły zaproponować model przyłączania się białek zaangażowanych w biogenezę miRNA do ich pierwotnego prekursorów, w którym SE pełni rolę platformy łączącej elementy mikroprocesora, spliceosomu i kompleksu wiążącego czapkę.

## ABSTRACT

**Introduction:** The mechanisms responsible for the gene expression regulation determine survival in a changing environment. microRNAs (miRNAs) are key components of this regulatory network. These single-stranded RNAs regulate the protein levels by cleavage of mRNA or translation inhibition. Plant microRNA biogenesis is a very complex, and still not fully understood process, that occurs in the cell nucleus. In plants, miRNAs are encoded mostly by independent transcription units, that are transcribed to long noncoding primary precursors (pri-miRNAs). These pri-miRNAs may contain miRNA sequences in introns or exons. Until now, an interplay between miRNA biogenesis and splicing of introns located in miRNA precursors has been reported. However, the key players of this crosstalk were unknown.

**The aim:** The main goal of the study was to identify the proteins responsible for the connection between the microprocessor and spliceosome and to characterize the detected interactions.

**Results:** The results presented in this study show that SE, a key component of the plant microprocessor, interacts directly with both subunits of AtCBC (the nuclear cap-binding complex that consists of two subunits, AtCBP20 and AtCBP80). The strongest interaction was observed when AtCBP20 and AtCBP80 interact with AtSE in a complex. Moreover, both CBC subunits bind to the full length SE protein as well as to the SE core (structured part of the protein). The identified AtCBC/SE complex serves as a molecular factor responsible for the regulation of pre-mRNA splicing and miRNA biogenesis.

In addition, during the study, direct interactions between SE and four U1 snRNP auxiliary proteins (AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b, AtLUC7rl) were detected. Two unstructured regions from the N- and C- termini of SERRATE are responsible for these interactions. The SE unstructured tails are sufficient for the binding of AtPRP40a, AtPRP40b and AtLUC7rl, while AtPRP39b requires probably the presence of the core part of SE and/or other U1 snRNP components to enable the binding of this protein. In the *se-2* Arabidopsis plants, where there is no communication between SE and its U1 snRNP partners, pri-miR1888a splicing defect and microprocessing changes were observed, as compared to the plants with active SE/U1 snRNP connection. Furthermore, the lack of SE and its U1 snRNP partners in Cajal bodies confirms that there is no direct connection between these nuclear structures and pri-miRNA maturation.

The results of the study allowed to propose a model of binding of proteins involved in miRNA biogenesis to pri-miRNA. In this model SE is a platform for communication between the plant microprocessor, spliceosome and cap binding complex.

### 1.1. BIOGENEZA ROŚLINNYCH miRNA

MikroRNA (miRNA) to krótkie cząsteczki kwasu rybonukleinowego o długości 21-24 nukleotydów, które zaliczane są do podstawowych elementów mechanizmu regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych. Tworzą one drugą co do wielkości grupę krótkich niekodujących RNA (sRNA, ang. *small RNA*). W przeciwieństwie do krótkich interferujących RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*), reprezentujących największą klasę sRNA, miRNA regulują aktywność genów na etapie post-transkrypcyjnym. Pierwszą cząsteczkę miRNA odkryto u nicienia *Caenorhabditis elegans* w 1993 roku (Lee i in., 1993). Wykazano, że ekspresja *lin-4*, zaangażowanego w regulację rozwoju tego organizmu, prowadzi do powstania dwóch transkryptów o długości około 22 i 61 nukleotydów. Obydwie te cząsteczki zawierają sekwencję komplementarną do regionu nieulegającego translacji (UTR, ang. *untranslated region*), zlokalizowanego na 3' końcu mRNA LIN-14 i przez przyłączenie się do niego hamują powstawanie białka. W 2000 roku zidentyfikowano kolejny gen kodujący miRNA u *C. elegans*, tj. *let-7* (Reinhart i in., 2000), którego produkt odkryto również u ludzi i *Drosophila* (Lee i Ambros, 2001). Doniesienia te sugerowały, że cząsteczki miRNA mogą być powszechnymi regulatorami ekspresji u wszystkich organizmów eukariotycznych. Pierwszy dowód istnienia miRNA u *Arabidopsis thaliana* przedstawiono w 2002 roku, w pracy opisującej 16 cząsteczek o poziomie zmieniającym się w trakcie rozwoju tej rośliny (Reinhart i in., 2002). Wynikiem kolejnych intensywnych lat badań nad miRNA jest obecnie znajomość ponad 400 takich cząsteczek u *A. thaliana* i ponad 1000 u ludzi, oraz przeświadczenie o ich fundamentalnej roli w rozwoju i funkcjonowaniu organizmów. W komórkach zwierzęcych uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego, różnicowania komórek, apoptozy oraz wielu procesów fizjologicznych takich jak hematopoeza, rozwój mięśni szkieletowych i serca, metabolizm cholesterolu, sekrecja insuliny i odpowiedź immunologiczna (Brennecke i in., 2003, Cuellar i McMnus, 2005, Poy i in., 2004, Chen i in., 2004, Wilfred i in., 2007, Harfe i in., 2005). U roślin wykazano ich wpływ na różnicowanie się tkanek i powstawanie organów, kontrolę przejścia rośliny z fazy rozwoju wegetatywnego w generatywny, regulację metabolizmu, przekazywanie sygnałów i odpowiedź na różnorodne czynniki stresowe np. niedobór soli mineralnych, suszę, zasolenie i atak patogenów (Mallory i in., 2004a, Aukerman i Sakai, 2003, Chen,

2004, Sunkar i Zhu, 2004, Chiou, 2006, Navarro i in., 2006, Barciszewska-Pacak i in., 2015). Tak istotna funkcja miRNA w komórkach wymaga ścisłej regulacji procesu ich powstawania.

### 1.1.1. Struktura i transkrypcja roślinnych genów miRNA (MIR)

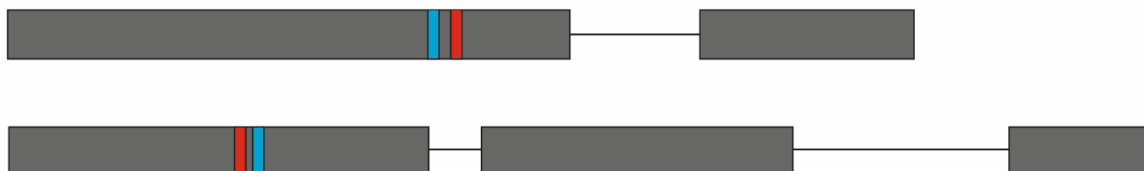
Dotychczasowe badania pozwoliły na poznanie struktury 82 genów kodujących miRNA u *A. thaliana* (Xie i in., 2005a, Szarzyńska i in., 2009, Kozomara i Griffiths-Jones, 2013, Zieleziński i in., 2015, Barciszewska-Pacak i in., 2016). Ich długość waha się w zakresie od 319 par zasad (pz) (*MIR165a*) do 4975 pz (*MIR472*) (Zieleziński i in., 2015). Wśród nich większość stanowi niezależne jednostki transkrypcyjne (67%, 55 przypadków), pozostałe to geny kodujące białka lub inne niekodujące RNA, zawierające miRNA w swoich intronach lub egzonach (Ryc. 1).

#### Niezależne jednostki transkrypcyjne

Bezintronowe



Zawierające introny



#### Geny kodujące białka i inne niekodujące RNA



**Ryc. 1 Schemat przedstawiający struktury klas genów kodujących miRNA u *Arabidopsis thaliana***

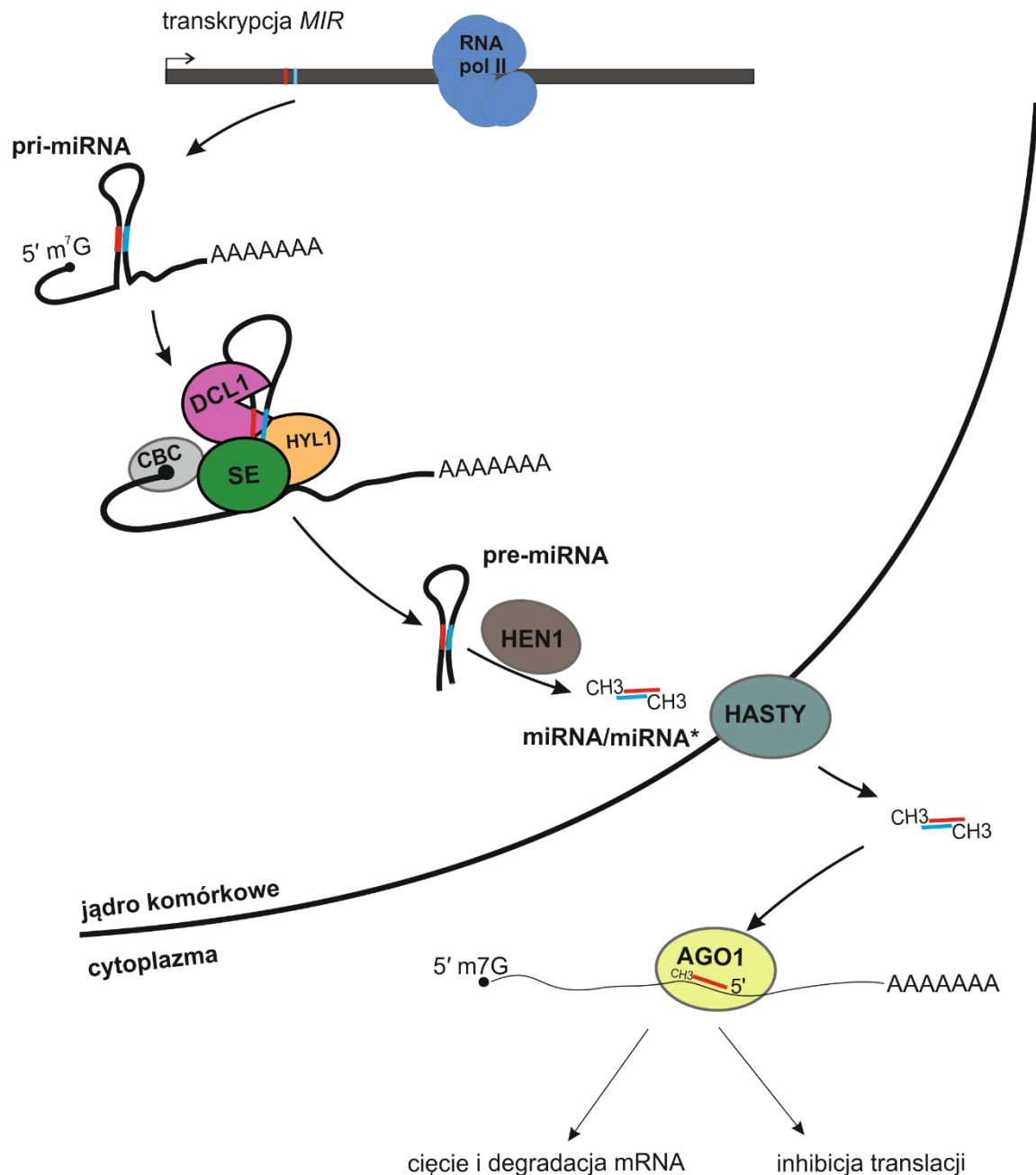
Wszystkie dotychczas poznane geny miRNA u roślin transkrybowane są przez DNA-zależną polimerazę RNA II (RNA Pol II) (Xie i in., 2005a). Podobnie do genów kodujących białka, zawierają więc one w swoich promotorach 8-nukleotydowy element regulatorowy TATA-box, znajdujący się w niedużej odległości od miejsca inicjacji transkrypcji. Ponadto, w regionach promotorowych wielu genów kodujących miRNA zidentyfikowano elementy odpowiedzi na stesy biotyczne i abiotyczne (Kruszka i in., 2012, Barciszewska-Pacak i in., 2015). Kolejne doniesienia literaturowe wskazują również na obecność więcej niż jednego miejsca inicjacji transkrypcji. Ciekawym tego przykładem jest *MIR170*, w którym zidentyfikowano pięć takich elementów (Zieleziński i in., 2015). Aktywność genów miRNA regulują również białka kompleksu, odpowiedzialnego za elongację transkrypcji. Wyciszenie genów kodujących elementy tej maszyny powoduje zmniejszenie ilości RNA Pol II zasocjowanej z chromatyną w rejonie *MIR*, przez co również obniżenie poziomu pri-miRNA (Fang i in., 2015). Kolejnym białkiem modulującym transkrypcję *MIR* jest CDC5 (CELL DIVISION CYCLE 5), które wiąże się do sekwencji promotorów genów miRNA i występuje w kompleksie z RNA Pol II (Zhang i in., 2013). Białka NOT2a i b (NEGATIVE ON TATA LESS 2), CDF2 (Cyclin DOF 2) oraz HOS1 (HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1) również biorą udział w regulacji transkrypcji *MIR*, jednakże nie wyjaśniono dotychczas ich dokładnej roli w tym procesie (Wang i in., 2013, Sun i in., 2015, Wang i in., 2015). Wszystkie wspomniane elementy zaangażowane w modulację aktywności *MIR* pozwalają więc na obszerną regulację biogenezy miRNA już na pierwszym etapie ich powstawania.

W wyniku transkrypcji *MIR* powstają długie niekodujące transkrypty, tzw. pierwotne prekursorzy (pri-miRNA), które podobnie do innych produktów RNA Pol II są stabilizowane przez dodanie do ich końców 5' struktury czapeczki (ang. *cap*), tj. 7-metyloguanozyny, a do końca 3' kilkuset nukleotydów adeninowych tzw. ogona poliA (Xie i in., 2005a). Elementem wyróżniającym pri-miRNA od mRNA jest charakterystyczna struktura typu spinki do włosów, składająca się z pętli i dwuniciowego odcinka, w którym często występują niesparowania. Cząsteczka miRNA może znajdować się zarówno w egzonach, jak i intronach takich transkryptów. Dotychczas wiadomo, że u *A. thaliana* około 67% prekursorów powstających z niezależnych jednostek transkrypcyjnych zawiera przynajmniej jeden intron (Xie i in., 2005a, Szarzyńska i in., 2009, Kozomara i Griffiths-Jones, 2013, Zieleziński i in., 2015). Wykazano też obecność tzw. policistronowych *MIR*, kodujących więcej niż jedną cząsteczkę miRNA,

tj. miR400-miR5654, miR842-miR846, miR771-miR851 i miR5026-miR850-miR863a (Jia i Rock, 2006, Merchan i in., 2009, Yang i in., 2011, Meng i in., 2012, Zieleziński i in., 2015). W przeciwieństwie do *A. thaliana*, policistronowych *MIR* nie zidentyfikowano dotychczas u przedstawiciela najstarszych roślin lądowych, tj. *Pellia endiviifolia*. Powstały one prawdopodobnie w trakcie ewolucji, gdyż u mchu *Physcomitrella patens* pierwotne prekursorzy miRNA zawierające więcej niż jedną strukturę spinki do włosów stanowią już około 25% całej puli zidentyfikowanych w tym gatunku pri-miRNA (Alaba i in., 2015). Tak skomplikowana struktura genów kodujących miRNA i ich pierwotnych transkryptów pozwala na szeroką regulację ich biogenezy na etapie post-transkrypcyjnym, m.in. dzięki zaangażowaniu alternatywnych zdarzeń wycinania intronów i poliadenylacji. Wymaga to jednak jednocześnie aktywności obszernej i zróżnicowanej maszynerii, odpowiedzialnej za dojrzewanie tych transkryptów.

### **1.1.2. Dojrzewanie pierwotnych prekursorów miRNA**

Głównymi elementami maszynerii biogenezy miRNA, zwanej mikroprocesorem, są endorybonukleaza typu III – DCL1 (DICER-LIKE 1), SE (SERRATE) i HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1). Proces dojrzewania pri-miRNA u roślin odbywa się całkowicie na terenie jądra komórkowego (Park i in., 2005) (Ryc. 2). Jest to cecha różniąca ten proces od biogenezy miRNA u zwierząt, gdzie dojrzewanie prekursorów miRNA podzielone jest na etap zachodzący w jądrze komórkowym i kolejny, odbywający się w cytoplazmie (Lee i in., 2002) (Tabela 1). U *A. thaliana* zidentyfikowano nawet specyficzne struktury na terenie nukleoplazmy, tzw. ciała D (ang. *dicing bodies*), które jak dotychczas uważane są za miejsce dojrzewania pierwotnych prekursorów miRNA (Song i in., 2007). W pierwszym etapie tego procesu pri-miRNA docinane są dzięki aktywności DCL1 do krótszych dwuniciowych form o strukturze spinki do włosów (pre-miRNA) (Kurihara i Watanabe, 2004). W kolejnym etapie z pre-miRNA uwalniany jest dupleks prawie całkowicie komplementarnych do siebie cząsteczek miRNA/miRNA\*. Cięcie prekursorów może odbywać się na dwa różne sposoby. W pierwszym, aktywność DCL1 obserwowana jest najpierw u podstawy spinki do włosów (Kurihara i Watanabe, 2004), natomiast w drugim, pierwsze cięcie odbywa się w regionie pętli znajdującej się na szczycie spinki (Bologna i in., 2009). Efektywność i precyzję przecinania prekursorów miRNA zapewniają białka SE i HYL1, z którymi DCL1 bezpośrednio oddziałuje (Dong i in., 2008, Hiraguri i in., 2005, Kurihara i in., 2006, Fang i Spector, 2007).



**Ryc. 2 Uproszczony schemat biogenezy i funkcjonowania miRNA w komórce roślinnej**

*RNA Pol II – DNA-zależna polimeraza RNA II; DCL1 – DICER-LIKE 1 (endorybonukleaza typu III); HYL1 – HYPONASTIC LEAVES 1; SE – SERRATE; CBC – kompleks wiążący czapkę; HEN1 – HUA ENHANCER 1 (metyltransferaza); HASTY – eksportyna; AGO1 – ARGONAUTE 1*

Tabela 1 Elementy różnicujące biogenezę i funkcjonowanie miRNA w komórkach roślinnych i zwierzęcych

Element różnicujący		Komórki roślinne	Komórki zwierzęce	Literatura
<b>Enzym odpowiedzialny za transkrypcję genów miRNA</b>		DNA-zależna RNA polimeraza II	DNA-zależna RNA polimeraza II i III	Xie i in., 2005; Lee i in., 2004 Borchert i in., 2006
<b>Lokalizacja biogenezы miRNA</b>		jądro komórkowe	I etap - jądro komórkowe II etap – cytoplazma	Park i in., 2005; Lee i in., 2002
<b>Mikroprocesor</b>	Główne białko	DCL1	I etap – Drosha II etap – Dicer	Park i in., 2002 Kurihara i Watanabe, 2004; Ketting i in., 2004 Knight i Bass, 2001 Lee i in., 2003
	Białka pomocnicze	SE, HYL1	I etap – DGCR8 II etap – TRBP	Dong i in., 2008; Han i in., 2004 Haase i in., 2005
<b>Długość pre-miRNA</b>		70 - kilkaset nukleotydów	55-70 nukleotydów	Xie i in., 2005a, Szarzyńska i in., 2009, Kozomara i Griffiths-Jones, 2013, Zieleziński i in., 2015
<b>Metylacja 3' końców miRNA</b>		tak	nie	Yu i in., 2005, Li i in., 2005
<b>Komplementarność miRNA::docelowy mRNA</b>		pełna	niepełna	Mallory i in., 2004b; Lai, 2002, Lewis i in., 2003
<b>Główny mechanizm regulacji ekspresji genów przy pomocy miRNA</b>		cięcie i degradacja docelowych mRNA	inhibicja translacji docelowych mRNA	Mallory i in., 2004b; Huntzinger i Izaurralde, 2011

*DCL1 – DICER-LIKE 1 (endorybonukleaza typu III); HYL1 – HYPONASTIC LEAVES 1; SE – SERRATE; DGCR8 - DiGeorge SYNDROME CRITICAL REGION 8, TRBP - TAR RNA-BINDING PROTEIN*

W dojrzewaniu pri-miRNA i pre-miRNA mogą uczestniczyć również inne białka z rodziny DCL (DCL3, DCL2, DCL4), jednakże najczęściej za ten proces odpowiedzialne jest DCL1 (Vazquez i in., 2008). O istotnej roli tej endonukleazy w komórce roślinnej świadczy fakt, że całkowite uszkodzenie *DCL1* ma charakter letalny (Schauer i in., 2002). Dostępność linii, w których uszkodzone są poszczególne domeny DCL1 pozwoliły na poznanie ich funkcji. W liniach *dcl1-7* (zamiana jednego aminokwasu w domenie helikazy) i *dcl1-9* (insercja T-DNA w sekwencji kodującej drugą domenę wiążącą dwuniciowy RNA) dochodzi do częściowego zatrzymania cięcia prekursorów miRNA, obserwowanego jako podwyższony poziom pri-miRNA i obniżony poziom dojrzałych cząsteczek (Park i in., 2002, Kurihara i Watanabe, 2004, Kurihara i in., 2006). Pomimo porównywalnego efektu tych mutacji, opisywane warianty białka DCL1 różnią się zdolnością do oddziaływania z HYL1. W linii *dcl1-7*, DCL1 występuje ciągle w bezpośrednim kontakcie z HYL1, w roślinach *dcl1-9* ta interakcja jest natomiast utracona. Ponadto, DCL1 w drugim z wymienionych mutantów zmienia lokalizację z ciał D, widocznych w roślinach typu dzikiego, na jednolity sygnał nukleoplazmatyczny (Fang i Spector, 2007, Fujioka i in., 2007). Mutacja w regionie kodującym domenę RNazy III, zidentyfikowana w linii *dcl1-13*, kompensuje brak białka HYL1 i przywraca normalny poziom pri-miRNA w liniach z unieczynnionym *HYL1* (Tagami i in., 2009).

Białkiem, którego aktywność w trakcie rozwoju roślin jest również bezwzględnie potrzebna jest SE. Mutacja całkowicie unieczynnijająca kodujący go gen, podobnie jak w przypadku *DCL1*, ma charakter letalny (Prigge i Wagner, 2001). SE w swojej strukturze zawiera wysoko ustrukturyzowany rdzeń, znajdujący się w centrum białka (Machida i in., 2011). Fragment ten przyjmuje kształt „kroczącego człowieka” (ang. *walking man topology*), składa się z trzech domen - aminowej, środkowej i palca cynkowego typu C2H2 - i jest niezbędny do oddziaływań z DCL1 i HYL1. Na obydwóch końcach SE znajdują się dodatkowo nieustrukturyzowane regiony, które w sumie stanowią połowę wielkości całego białka. Jeden z nich, tj. fragment aminowy, zawierający rejon bogaty w argininy i proliny jest odpowiedzialny za wiązanie pri-miRNA (Iwata i in., 2013). Podobnie jak w przypadku *DCL1*, scharakteryzowano również słabe mutanty *SE*, tj. *se-1*, *se-2* i *se-3*. W przypadku dwóch pierwszych linii, mutacje znajdują się w sekwencji kodującej karboksylowy nieustrukturyzowany fragment SE, podczas gdy w *se-3* insercja T-DNA zlokalizowana jest w regionie odpowiadającym końcowi aminowemu. We wszystkich tych liniach zaobserwowano podwyższony poziom wielu pri-miRNA i obniżony poziom dojrzałych

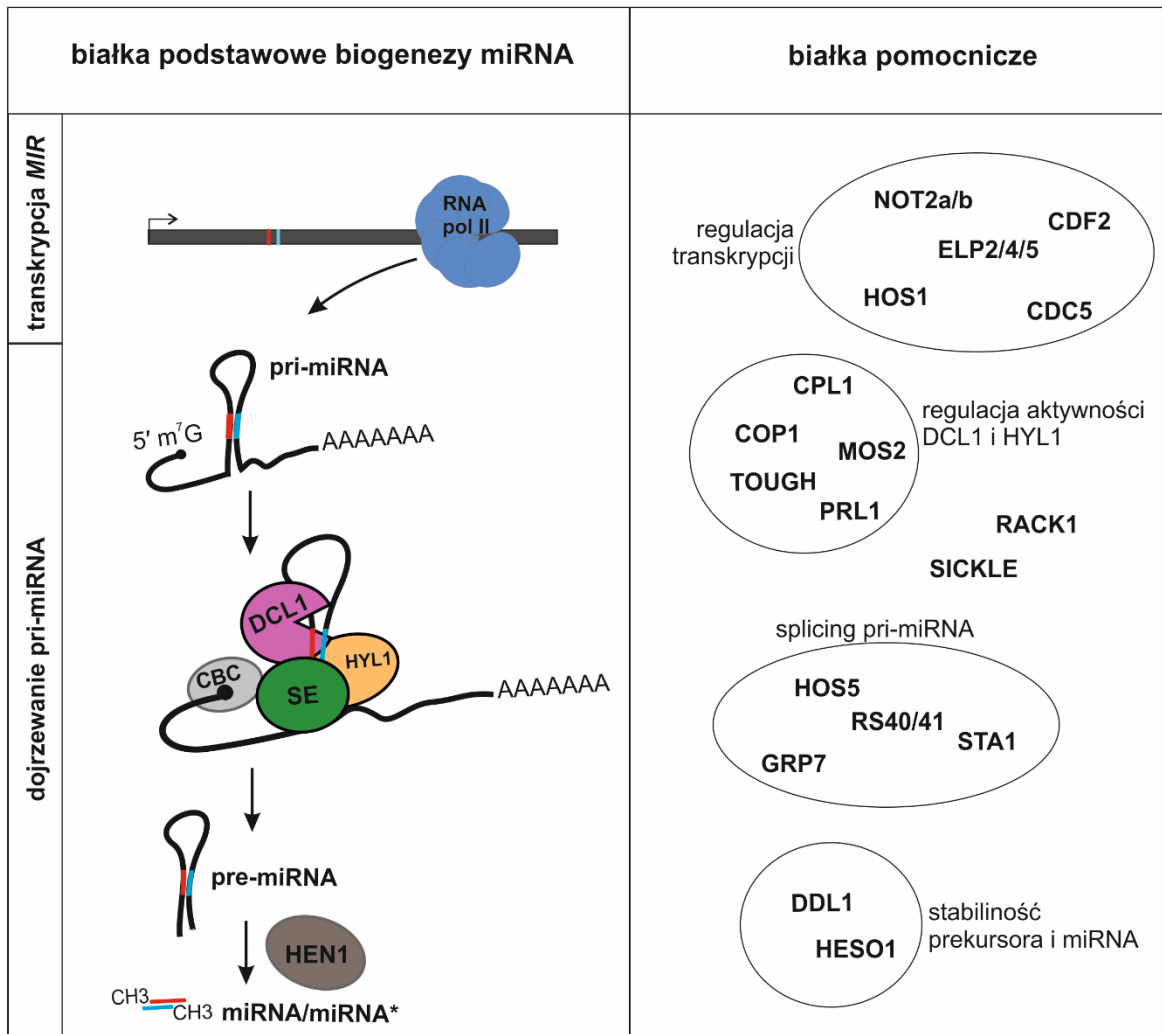
cząsteczek, jak również fenotyp o plejotropowym charakterze (Prigge i Wagner, 2001, Grigg i in., 2005, Zieleziński i in., 2015). Dokładna tego przyczyna w mutantach *se-1* i *se-2*, tak więc i funkcja końca karboksylowego SE, nie była jeszcze jednak znana.

HYL1, należące do rodziny białek DRB (ang. *double stranded RNA-binding protein*), zawiera dwie domeny wiążące dwuniciowy RNA (dsRBD) (Hiraguri i in., 2005). Pierwsza z nich jest odpowiedzialna za wiązanie RNA, druga natomiast za oddziaływanie z dsRBD2 DCL1 i SE oraz za homodimeryzację białka, wymaganą w trakcie biogenezy miRNA (Hiraguri i in., 2005, Yang i in., 2010). Obydwie domeny dsRBD HYL1 są wystarczające dla właściwego przebiegu dojrzewania pri-miRNA (Wu i in., 2007). Nieznana jest do tej pory funkcja pozostałej części tego białka, tj. długiego, częściowo nieustrukturyzowanego fragmentu, zawierającego sześć 28-aminokwasowych powtórzeń na swoim końcu karboksylowym. W przeciwieństwie do mutacji unieczyniającej całkowicie *SE* i *DCL1*, uszkodzenie genu kodującego HYL1 nie ma charakteru letalnego (Lu i Fedoroff, 2000). W linii *hyl1-2* zaobserwowano podwyższony poziom większości pri-miRNA i mniejszą ilość miRNA (Szarzyńska i in., 2009).

Poza aktywnością kompleksu DCL1-SE-HYL1, w dojrzewaniu pri-miRNA uczestniczą również inne białka (Ryc. 2 i 3). Pierwszym elementem oddziałującym z nowopowstałym transkryptem jest kompleks wiążący czapeczkę (AtCBC, ang. *cap binding complex*), składający się z dwóch podjednostek, tj. AtCBP20 i AtCBP80 (Kmieciak i in., 2002). U *A. thaliana* wykazano, że białka te oddziałują ze sobą bezpośrednio oraz, że białko AtCBP20 odgrywa zasadniczą rolę w transporcie AtCBC do jądra komórkowego (Kierzkowski i in., 2009). Funkcje CBC w organizmach roślinnych nie są jeszcze tak dobrze poznane, jak u zwierząt, gdzie kompleks ten uczestniczy w dojrzewaniu mRNA, głównie poprzez stabilizowanie oddziaływań między miejscem donorowym pierwszego intronu a snRNP U1 (Lewis i in., 1996). Co więcej, CBC pełni również rolę w formowaniu końca 3' mRNA, stabilizując kompleks białkowy odpowiedzialny za cięcie pre-mRNA w miejscu poliadenylacji (Flaherty i in., 1997). Wykazano jego funkcję również w transporcie mRNA i snRNA z jądra do cytoplazmy (Izaurrealde i in., 1995). U roślin potwierdzono jak dotychczas rolę CBC w splicingu pre-mRNA, w który zaangażowane jest również SE (Laubinger i in., 2008, Raczyńska i in., 2010, 2014). Podwójny mutant zerowy genów kodujących podjednostki AtCBC wykazuje podobieństwa do *se-1* zarówno pod względem fenotypu, jak i zaburzeń biogenezy miRNA (Laubinger i in., 2008, Zieleziński i in., 2015).

W trakcie biogenezy miRNA aktywność DCL1 jest regulowana dodatkowo przez białko PRL1 (PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS1) oraz TGH (TOUGH) (Zhang i in., 2014, Ren i in., 2012a) (Ryc. 3). Drugie z wymienionych białek wpływa również na ilość pri-miRNA zasocjowanych z HYL1. Prawidłowe funkcjonowanie HYL1 w dojrzewaniu prekursorów miRNA zależy z kolei od statusu jego fosforylacji, który reguluje białko CPL1 (C-TERMIANL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1) (Manavella i in., 2012). Wykazano, że dzięki oddziaływaniom CPL1 z SE i HYL1, utrzymywana jest defosforylacja ostatniego z wymienionych białek, wymagana dla prawidłowego przebiegu procesu biogenezy miRNA (Jeong i in., 2013). Aktywność HYL1 regulowana jest również przez inne elementy komórkowe. MOS2 (MODIFIER OF SNC2) to białko wiążące RNA, którego obecność wymagana jest dla prawidłowej lokalizacji HYL1 w ciałach D (Wu i in., 2013). Kolejne białko, nazywane dotychczas proteazą X, odcina aminowy fragment HYL1, prowadząc w ten sposób do degradacji HYL1 (Cho i in., 2014). COP1 (CONSTANS PHOTOMORPHOGENIC 1) zapobiega natomiast temu procesowi podczas ekspozycji roślin na światło, kiedy specjalnie w tym celu przenoszone jest do cytoplazmy. W przypadku białek SIC (SICKLE) i RACK1 (RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE), nie poznano dokładnego mechanizmu ich zaangażowania w biogenezę miRNA. Pierwsze z nich znajduje się w miejscu występowania HYL1, przez co sugeruje się, że może stymulować jego funkcjonowanie (Zhan i in., 2012). W mutancie *rack-1* zaobserwowano natomiast obniżony poziom większości miRNA w porównaniu do roślin typu dzikiego, co może być efektem zaburzenia bezpośredniego oddziaływania między RACK1 i SE (Speth i in., 2013).

Wynikiem aktywności wszystkich wspomnianych wyżej białek jest uwolnienie z pierwotnego prekursora dupleksu miRNA/miRNA\* tj., dwuniciowego RNA o długości 21-24 nukleotydów, który w celu uniknięcia degradacji ulega następnie specyficznej dla roślin metylacji (Yu i in., 2005, Li i in., 2005). Białkiem odpowiedzialnym za ten proces jest HEN1 (HUA1 ENHANCER1), które rozpoznaje dwa niesparowane nukleotydy na 3' końcach obydwóch nici i w obecności jonów magnezu katalizuje proces 2'-O-metylacji (Boutet i in., 2003, Yang i in., 2006, Huang i in., 2009). Prowadzi to do inhibicji uryldacji 3' końców RNA, prowadzonej przez białko HESO1 (HEN1 SUPPRESOR1) (Ren i in., 2012b). Dupleksy miRNA/miRNA\* po metylacji są następnie transportowane do cytoplazmy dzięki aktywności eksportyny HST (HASTY) (Bollman i in., 2003).



**Ryc. 3 Schemat biogenezy miRNA u roślin z zaznaczeniem białek pomocniczych, zaangażowanych w ten proces**

*DCL1* – DICER-LIKE 1 (endorybonukleaza typu III); *HYL1* – HYPONASTIC LEAVES 1; *SE* – SERRATE; *CBC* – kompleks wiążący czapkę; *HEN1* – HUA ENHANCER 1 (metyltransferaza); *NOT2* – NEGATIVE ON TATA LESS 2; *CDC5* – CELL DIVISION CYCLE; *CDF2* – CYCLING DOF TRANSCRIPTION FACTOR 2; *ELP* – ELONGATOR PROTEIN; *HOS* – HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES; *CPL1* – C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE LIKE 1; *COP1* – CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1; *MOS2* – MODIFIER OF SNC1-2; *PRL1* – PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1; *RACK1* – RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1; *STA1* – STABILIZED1; *RS* – ARGININE/SERINE-RICH SPLICING FACTOR; *GRP7* – GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN; *HESO1* – HEN1 SUPPRESSOR 1; *DDL1* – DAWDLE

## 1.2. FUNKCJONOWANIE miRNA W CYTOPLAZMIE

W cytoplazmie jedna z cząsteczek dupleksu miRNA/miRNA\* jest włączana w kompleks efektorowy RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Głównym jego elementem jest białko AGO (ARGONAUTE), które posiada aktywność katalityczną wymaganą po rozpoznaniu i związaniu docelowego mRNA. Pomimo obecności u *A. thaliana* 10 białek AGO, AGO1 jest głównym elementem odpowiedzialnym za regulację ekspresji genów przy udziale miRNA (Baumberger i Baulcombe, 2005). Rola tego białka w organizmach roślinnych jest tak istotna, że mutacja unieczynnająca całkowicie *AGO1* prowadzi do ich zamierania na etapie siewki (Bohmert i in. 1998). Dokładny mechanizm przyłączania jednej z nici dupleksu miRNA/miRNA\* do AGO1 nie jest jeszcze poznany. Dotychczasowe doniesienia wskazują na rolę białka szoku cieplnego HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN) w tym procesie (Iki i in., 2010). W 2010 roku zaproponowano model, w którym do AGO1 wiąże się dimer HSP90. Następnie do białka szoku cieplnego przyłączane jest ATP, którego hydroliza prowadzi do zmiany konformacji HSP90 i AGO1, co daje drugiemu z tych białek możliwość związania dwuniciowego RNA. W przeciwieństwie do dupleksu siRNA, w przypadku miRNA/miRNA\* nie jest wymagana aktywność katalityczna AGO1 w celu uwolnienia jednej z nici. Wybór nici odbywa się na podstawie różnicy w termostabilności ich końców 5' – nić o niższej termostabilności jest zatrzymywana w kompleksie RISC, jako nić wiodąca (Eamens i in., 2009). Wykazano jednocześnie, że brak białka HYL1 w komórce powoduje zaburzenia tego procesu.

Po uwolnieniu jednej nici z miRNA/miRNA\*, kompleks RISC rozpoznaje docelowy mRNA dzięki komplementarności zasad między miRNA i mRNA oraz reguluje jego poziom na drodze jednego z dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich to endonukleolityczne cięcie transkryptu, katalizowane przez AGO1 (Parker i in., 2004). Proces ten zachodzi częściej u roślin niż u zwierząt ze względu na wysoką komplementarność między miRNA i mRNA, występującą w pierwszej grupie organizmów (Mallory i in., 2004b). W wyniku tej aktywności AGO1 transkrypt zostaje zdegradowany. Aktywność niektórych miRNA prowadzi do powstania innej klasy krótkich RNA tzw. ta-siRNA (ang. *trans-acting interfering RNA*) (Allen i in., 2005, Gascioli i in., 2005). Cząsteczki te generowane są ze specyficznych dla nich transkryptów RNA Pol II, tj. TAS RNA, do których po cięciu katalizowanym przez AGO4 zasocjowanym z miRNA, dosyntetyzowana jest druga nić, dzięki aktywności RNA-zależnej polimerazy RNA

(RDR6). Taki dwuniciowy substrat jest następnie trawiony przez DCL4 do 21-nukleotydowych krótkich RNA (Vazquez i in., 2004, Xie i in., 2005b).

Drugi sposób regulacji powstawania białek przez miRNA polega na hamowaniu translacji mRNA. Pierwsze doniesienie na ten temat u *Arabidopsis* dotyczyło linii ze zwiększoną zawartością miR172a, w której zaobserwowano zmniejszoną ilość białka APETALA2 bez wpływu na poziom jego mRNA (Aukerman i Sakai, 2003). Wiadomo jednak, że wspomniane miRNA może również prowadzić do cięcia transkryptu pochodzącego z *AP2*, gdyż zidentyfikowano produkty tej reakcji (Kasschau i in., 2003). Dokładny mechanizm hamowania translacji przy udziale miRNA nie jest jeszcze poznany. Ostatnie doniesienia sugerują, że proces ten odbywa się przy udziale siateczki endoplazmatycznej (ER), a dokładnie zasocjowanego z nią białka AMP1 (ALTERED MERISTEM PROGRAM1) (Li i in., 2013). W polisomach związanych z ER udokumentowano zależną od AMP1 obecność AGO1 oraz występowanie docelowych mRNA. Ponadto, wykazano również, że o sposobie regulacji ekspresji genów przez miRNA decyduje partner DCL1, tj. HYL1 lub DRB2. Obecność HYL1 prowadzi do cięcia transkryptu, natomiast DRB2 do hamowania translacji (Reis i in., 2015).

### **1.3. ZWIĄZEK BIOGENEZY miRNA Z INNYMI PROCESAMI METABOLIZMU RNA**

Przedstawiona powyżej złożoność struktury *MIR* oraz procesu biogenezy miRNA wymaga, ale również umożliwia zaangażowanie innych maszynerii metabolizmu RNA w regulację poziomu tych krótkich RNA w komórce. W trakcie ostatnich lat badań pojawiały się informacje o powiązaniu biogenezy miRNA ze splicingiem. Pierwsza z nich to identyfikacja intronów w niezależnych jednostkach transkrypcyjnych kodujących miRNA, a także obecność tych krótkich RNA w intronach genów kodujących białka i inne RNA (Rajagopalan i in., 2006, Szarzyńska i in., 2008, Zieleziński i in., 2015). Szczególnie w tym drugim przypadku powinna występować zależność między biogenezą miRNA i procesem wycinania intronów, jednakże wykazano, że splicing odgrywa również istotną rolę w dojrzewaniu prekursorów zawierających strukturę spinki do włosów w swoich egzonach (egzonowe miRNA) (Bielewicz i in., 2013, Schwab i in., 2013).

W celu oceny roli splicingu intronów w prekursorach egzonowych miRNA, rośliny *A. thaliana* z nieaktywnym *MIR163* transformowano konstruktami, w których w genie kodującym miR163 usunięto intron lub zmutowano jego miejsce donorowe,



Kolejny przykład niezbędnej roli splicingu w trakcie biogenezy miRNA pochodzi z badań nad rodziną miR444 u roślin jednoliściennych. Częsteczki miRNA i miRNA\* rozdzielone są w ryżu, *Brachypodium*, kukurydzy, trzcinie cukrowej i pszenicy intronem, którego wycięcie jest wymagane dla powstania prawidłowego substratu dla maszynerii biogenezy miRNA (Lu i in., 2008, Sunkar i Jagadeeswaran, 2008). Wycięcie intronu jest też niezbędne w trakcie powstawania miR400, znajdującego się u *A. thaliana* w intronie genu kodującego białko o nieznanym do tej pory funkcji (Yan i in., 2012). W wyniku stresu temperaturowego (37 °C) zaobserwowano wzmożone wycinanie intronu, co korelowało z podniesieniem poziomu dojrzałej cząsteczki. Stymulującą rolę ciepła w wycinaniu intronów, w których znajdują się cząsteczki miR160a i miR5175a zaobserwowano również w jęczmieniu (Kruszka i in., 2014). Ze zwiększoną aktywnością spliceosomu związana była efektywniejsza biogeneza tych miRNA. Przeciwną relację zaobserwowano natomiast analizując dojrzewanie pri-miR162a (Barciszewska-Pacak i in., 2016). W wyniku traktowania roślin *A. thaliana* suszą i stresem solnym zahamowano wycinanie intronu zawierającego miR162a, czemu towarzyszył wzrost poziomu dojrzałej cząsteczki w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

W komórkach ludzkich zaobserwowano, że częściowe wyciszenie genu kodującego ludzki homolog AtU1-70K, jeden z głównych elementów snRNP U1, powoduje obniżenie poziomu intronowej cząsteczki miR211 (Janas i in., 2011). W kompleksie z maszyną splicingową odnotowano natomiast obecność prekursorów innych cząsteczek, tj. miR106b, miR93 i miR25 (Agranat-Tamir i in., 2014). Wykazano również, że zahamowanie splicingu intronu, w którym te prekursory się znajdują, powoduje podniesienie poziomu dojrzałych cząsteczek. Ponadto, częściowe wyciszenie ekspresji genu kodującego Drosha, głównego enzymu odpowiedzialnego za dojrzewanie pri-miRNA w jądrze komórek ludzkich, związane było ze zwiększoną wydajnością wycinania wspomnianego intronu.

Opisane powyżej przypadki wskazują na ścisłe powiązanie procesu wycinania intronów i biogenezy miRNA. Nie wiadomo jednak było, które białka odpowiedzialne są za tę regulację. W proces ten mogłyby być zaangażowane SE i CBC, ze względu na opisaną ich podwójną funkcję w dojrzewaniu RNA (Laubinger i in., 2008, Raczyńska i in., 2010, 2014). Jak już wyżej wspomniano, białka te biorą udział w biogenezie miRNA, jak również w wycinaniu intronów i alternatywnym składaniu transkryptów. U *A. thaliana* zidentyfikowano też inne białka, oddziałujące z elementami maszynerii biogenezy miRNA i/lub zaangażowane w wycinanie intronów z pri-miRNA. Do białek tych należy STA1

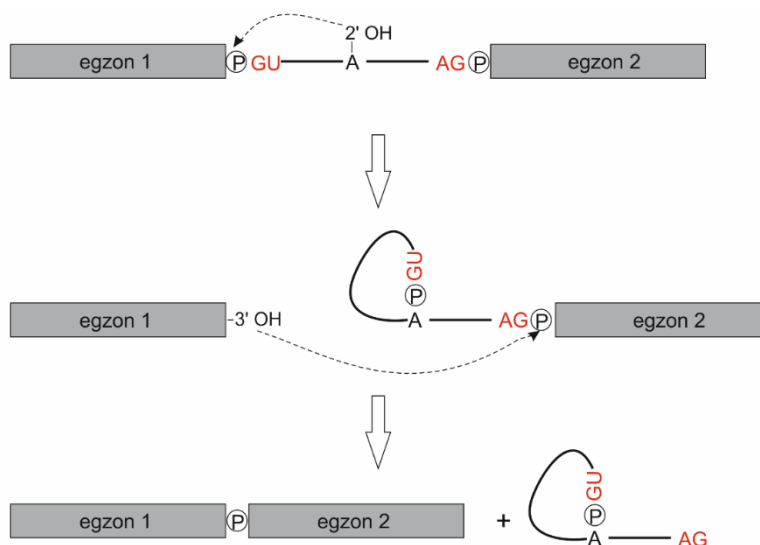
(STABILIZED 1), GRP7 (GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN), PRL1 (oddziałujące z DCL1, SE i HYL1), HOS5 (oddziałujące z SE, HYL1 i CPL1) oraz dwa białka należące do rodziny białek bogatych w reszty seryny i argininy (SR), tj. RS41 i RS41 (Chaabane i in., 2012, Koster i in., 2014, Zhang i in., 2014). Dokładny mechanizm aktywności tych białek, jak również bezpośredniego powiązania maszyny biogenezy miRNA i spliceosomu nie jest jednak znany.

#### 1.4. SPLICING U ROŚLIN

Ze względu na to, że większość genów organizmów eukariotycznych zbudowana jest z sekwencji niekodujących (intronów) oraz kodujących (egzonów), splicing jest jednym z podstawowych etapów ekspresji genów. Zidentyfikowano dwa typy intronów: U2 i U12. Pierwszy z nich charakteryzuje się obecnością dinukleotydu GU na 5' końcu intronu (miejsce donorowe; splicingowe 5') i AG w miejscu akceptorowym (splicingowym 3') (Brown i in., 1996). Dodatkowo między 20. a 50. nukleotydem powyżej miejsca akceptorowego intronu znajduje się tzw. miejsce rozgałęzienia (ang. *branch point*) z charakterystycznym dla niego nukleotydem adeninowym. Odległość między miejscem rozgałęzienia i akceptorowym jest mniejsza w przypadku intronów typu U12 (Tarn i Steitz, 1997). Nie zawierają one również charakterystycznego dla intronów U2 traktu polipirymidynowego, a w miejscach splicingowych pierwotnie zidentyfikowano dinukleotyd AU (miejsce donorowe) i AC (miejsce akceptorowe) (Kolossova i Padgett, 1997). Później wykazano jednak, że częściej w tych regionach występuje para GT-AG (Lewandowska i in., 2004).

Splicing jest to proces chemiczny składający się z dwóch reakcji transestryfikacji (Ryc. 5). Rozpoczyna się on atakiem grupy hydroksylowej 2' nukleotydu adeninowego z miejsca rozgałęzienia na pierwszy nukleotyd intronu od strony 5' (miejsca donorowego) i rozcięciem wiązania fosfodiesterowego. Jednocześnie powstaje nowe wiązanie 5'-2' fosfodiesterowe, które prowadzi do generacji charakterystycznego produktu o kształcie lassa (ang. *lariat intermediate*) i uwolnienia egzonu od strony 5' transkryptu. W drugim etapie grupa hydroksylowa uwolnionego egzonu atakuje i rozcina wiązanie fosfodiesterowe, znajdujące się na 3' końcu intronu (miejsce akceptorowe). W ten sposób usunięty zostaje intron a kolejna reakcja transestryfikacji prowadzi do połączenia dwóch egzonów ze sobą. Ze względu na to, że liczba wiązań fosfodiesterowych pozostaje taka sama, reakcje splicingu nie wymagają dostępności dodatkowych źródeł energii w postaci ATP lub GTP

(Berget i in., 1977, Padgett i in., 1986). Wymagane są one jednakże do złożenia maszyneryi zaangażowanej w wycinanie intronów.



### Ryc. 5 Schemat reakcji splicingu pre-mRNA

Przerywanymi strzałkami przedstawiono dwie reakcje transestryfikacji; GU, AG – miejsca donorowe i akceptorowe; A – nukleotyd adeninowy znajdujący się w miejscu rozgałęzienia; P – wiązanie fosfodiesterowe.

Za proces splicingu odpowiedzialny jest duży kompleks rybonukleoproteinowy (RNP) – spliceosom. Ze względu na substrat i skład wyróżnia się dwa typy spliceosomów, tj. konstytutywny, wycinający introny U2, i niekanoniczny, związany z intronami U12. Obydwie maszynerye składają się z pięciu krótkich jądrowych RNA, bogatych w reszty urydynowe (snRNA U, ang. *U-rich small nuclear RNA*) oraz ponad setki białek. Spliceosom konstytutywny zawiera 5 typów snRNA U, tj. U1, U2, U4, U5 i U6. Cztery z nich powstają na drodze transkrypcji dzięki polimerazie RNA II, natomiast snRNA U6 wymaga aktywności polimerazy RNA III (Waibel i Filipowicz, 1990). W spliceosomie niekanonicznym w zamian za snRNA U1, U2, U4 i U6, występują cząsteczki U11, U12, U4atac i U6atac (Tarn i Steitz, 1997). Cząsteczki snRNA w połączeniu z białkami specyficznymi, Sm i Lsm tworzą większe struktury wchodzące w skład trzonu spliceosomu, tj. kompleksów rybonukleoproteinowych - snRNP (ang. *small nuclear ribonucleoproteins*).

Badania prowadzące do wyselekcjonowania genów kodujących elementy spliceosomu kanonicznego u *A. thaliana* doprowadziły do identyfikacji 74 genów

kodujących snRNA U i ponad 395 genów kodujących białka (Wang i Brendel, 2004). Ponadto, zidentyfikowano 15 białek Sm, z których siedem znajduje się w kompleksie snRNP U1, U2, U4 i U5, a kolejne siedem (Lsm, Lsm-like) buduje snRNP U6 (Will i Lührmann, 2001). Pozostałe jedno białko, Lsm1, nie ma zdolności do wiązania snRNA. Funkcją białek Sm jest tworzenie platformy do oddziaływań z białkami specyficznymi dla każdego kompleksu snRNP.

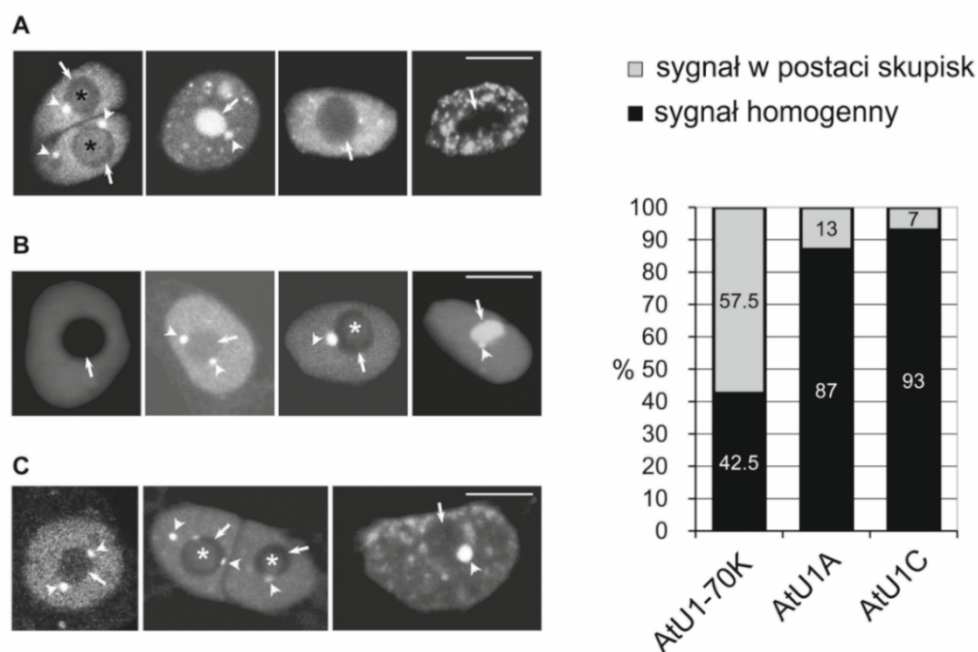
Mechanizm tworzenia się konstytutywnego spliceosomu u roślin nie jest jeszcze scharakteryzowany. U zwierząt proces ten zaczyna się od związania snRNP U1 z miejscem donorowym i snRNP U2 z miejscem rozgałęzienia (Reed 1996) (Ryc. 6). Proces rozpoznania tych elementów wymaga komplementarności sekwencji pre-mRNA z odpowiednią częścią snRNA U (Kandel-Lewis i Seraphin, 1993). Zazwyczaj snRNP U1 oddziałuje z transkrypcją jako pierwszy, jednakże u drożdży dowiedziono, że kolejność przyłączania snRNP U1 i U2 może być odwrócona (Shcherbakova i in., 2013). W wyniku związania obydwóch wspomnianych rybonukleoprotein powstaje tzw. kompleks A, do którego utworzenia wymagana jest dodatkowo hydroliza ATP (Barabino i in., 1990). Energia potrzebna jest również w kolejnym etapie, w trakcie związania potrójnego kompleksu tri-U5/U4/U6 snRNP, które prowadzi do powstania kompleksu B. Następnie snRNP U1 oddysocjowuje od miejsca donorowego, uwalniając w ten sposób region związania dla snRNP U6, do którego dochodzi po uwolnieniu snRNP U4 (kompleks B'). Odłączenie tej ostatniej rybonukleoproteiny jest wymagane ze względu na to, że snRNA U4 i U6 oddziałują ze sobą w momencie rekrutacji do spliceosomu (Teigelkamp i in., 1994, Roy i in., 1995). Uwolnienie snRNP U4 umożliwia zbudowanie kompleksu między U6 i U2, który uważany jest za centrum katalityczne spliceosomu. snRNP U4 pełni więc w komórce rolę inhibitora, blokując aktywność U6 dopóki nie dojdzie do prawidłowej orientacji miejsc splicingowych względem siebie (Wassarman i Steitz, 1993). W wyniku oddziaływania między snRNP U6 i U2 zachodzi reakcja transestryfikacji, prowadząca do powstania produktu pośredniego o strukturze lassa (kompleks C). Ze strukturą tą związane pozostają kompleksy U2, U5 i U6, miejsce akceptorowe zostaje rozcięte, a egzony ulegają ligacji. Intron następnie jest uwalniany z maszyny splicingowej i degradowany, a wszystkie kompleksy snRNP mogą być ponownie wykorzystane (Rogers i Wall, 1980).

Ze względu na doniesienia wykazujące istotną rolę miejsca donorowego intronu w biogenezie miRNA, kompleks snRNP U1 wydaje się być szczególnie interesującym



rybonukleoproteiny jest również niekodujący RNA, tj. snRNA U1. U *A. thaliana* zidentyfikowano 14 genów kodujących tą cząsteczkę (Wang i Brendel, 2004). Wykazano, że w jej ludzkim odpowiedniku występują cztery charakterystyczne struktury spinki do włosów. Spinka do włosów nr I oddziałuje z białkiem U1-70K, spinka do włosów nr II z białkiem U1A, a spinki do włosów nr III i IV łączą się z heteroheptametrycznym pierścieniem, który budują białka SmB/B', SmD1/2/3, SmE, SmF, i SmG (Jovine i in., 1996). Zasady numer 3-10 snRNA wiążą się natomiast z miejscem donorowym pre-mRNA. Za stabilizację oddziaływania między tymi dwiema cząsteczkami RNA i utrzymanie całego kompleksu w aktywnej konformacji odpowiedzialne są białka U1A, U1C i U1-70K (Liao i in., 1992).

Białko U1A pełni swoją funkcję dzięki obecności dwóch ewolucyjnie zakonserwowanych motywów rozpoznających RNA (RRM, ang. *RNA recognition motif*) (Scherly i in., 1989, Will i in., 1993). Analizy mające na celu określenie lokalizacji U1A w komórce roślinnej wykazały jego obecność w jądrze komórkowym jak również w cytoplazmie (Lorkovic i in., 2008a) (Ryc. 7).



**Ryc. 7 Lokalizacja białek podstawowych kompleksu snRNP U1 w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

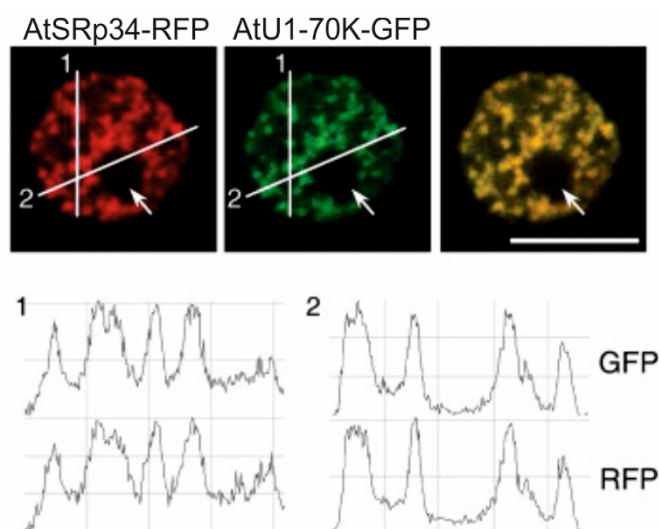
Lokalizację (A) *AtU1-70K*, (B) *AtU1A* i (C) *AtU1C* zaprezentowano na zdjęciach, przedstawiających komórki z różnymi rodzajami sygnałów jakie uzyskano (lewy panel) i w wartościach liczbowych, przedstawiających procentowy udział sygnału homogennego i w postaci skupisk (prawy panel); strzałki i gwiazdki wskazują jąderko; grot strzałek wskazują ciała Cajala, skala równa się 8  $\mu$ m (Lorkovic i in., 2008a, zmodyfikowane).

Ponadto, białko to w jądrze występuje również w tzw. ciałach Cajala, tj. sferycznych, dynamicznych strukturach bogatych w białka splicingowe i pre-mRNA (Carmo-Fonseca i in., 1991) (Ryc. 7). Struktury te zawierają również wiele komponentów jąderkowych, w tym fibrylarynę i snoRNP U3 (Raska i in., 1990, Jimenez-Garcia i in., 1994). Dokładna funkcja ciał Cajala nie jest scharakteryzowana, sugeruje się jednak ich rolę w składaniu lub recyklingu elementów splicingowych, dojrzewaniu 3' końców histonowych mRNA oraz procesowaniu lub transporcie snRNA U3 (Shaw i in., 1993, Gall i in., 1995, Lamond i Earnshaw, 1998). Z tego powodu ciała Cajala często występują na peryferiach jąderka, w którym również obserwowano AtU1A (Lorkovic i in., 2008a) (Ryc. 7).

Kolejne białko snRNP U1 u *A. thaliana*, tj. AtU1C, charakteryzuje się podobnym sygnałem do AtU1A (Lorkovic i in., 2008a) (Ryc. 7). Obecne jest ono w jądrze oraz w cytoplazmie. U1C, jako jedyne z białek rdzeniowych snRNP U1 nie ma zdolności do samodzielnego wiązania RNA (Nelissen i in., 1991). W tym celu białko to potrzebuje obecności innych elementów kompleksu, w oddziaływanie z którymi uwikłany jest jego motyw palca cynkowego (Nelissen i in., 1991). Wspomniany wyżej dodatkowy sygnał cytoplazmatyczny, jakim charakteryzuje się AtU1A jak i również AtU1C, może sugerować dodatkową rolę tych białek w komórce, poza uczestnictwem w splicingu. W przypadku ludzkiego U1A wykazano, że może ono regulować poziom własnego mRNA poprzez przyłączanie się do końca 3' UTR i inhibicję aktywności polimerazy poliA (PAP) (Boelens i in., 1993). W procesie tym wymagana jest homodimeryzacja białka zanim zwiąże ono specyficzną sekwencję mRNA nazywaną PIE (ang. *polyadenylation inhibition element*) (van Gelder i in., 1993, Gunnewiek i in., 2000). W przeciwieństwie do ludzkiego białka U1A, roślinny jego odpowiednik nie bierze udziału w regulacji własnego poziomu, ale ma zdolność wiązania ludzkiego mRNA U1A w regionie 5'UTR (Simpson i in., 1995). Nie wiadomo więc nadal, z jaką funkcją może się wiązać obecność AtU1A i AtU1C w cytoplazmie komórek roślinnych.

Białko AtU1-70K jest najlepiej poznanym białkiem kompleksu snRNP U1 u *A. thaliana*. Na jego zakonserwowanym aminowym końcu znajdują się domeny wiążące RNA (RRM) oraz rejon bogaty w glicynę. Rolę tego regionu odkryto w trakcie eksperymentów prowadzonych w komórkach drożdżowych na homologue roślinnego U1-70K, tj. SNP1. W wyniku uszkodzenia jego genu w rejonie kodującym koniec aminowy białka, zaobserwowano zaburzenia splicingu i podziałów komórek (Hilleren i in., 1995). Na karboksylowym końcu AtU1-70K znajdują się natomiast motywy bogate

w argininę i serynę (ang. *RS-rich*), odpowiedzialne za oddziaływania z białkami splicingowymi AtSR, tj. SR33, SR45, SRZ21, SRZ22 (Golovkin i Reddy, 1998, 1999). Aktywność AtU1-70K regulowana jest przez dwa procesy – alternatywny splicing i fosforylacja. Wykazano, że z genu kodującego to białko powstają dwa transkrypty - długi, zawierający intron o długości 910 nukleotydów i krótki, który jest jego pozbawiony (Golovkin i Reddy, 1996). Funkcjonalne białko, wiążące się specyficznym z snRNA U1, powstaje z krótszej izoformy splicingowej, stąd zachowanie intronu prowadzi do eliminacji aktywności U1-70K w komórce roślinnej. Drugim kluczowym mechanizmem regulacji tego białka jest fosforylacja w regionie RS, która w przypadku dodania trzech reszt fosforanowych prowadzi do inaktywacji AtU1-70K i splicingu (Tazi i in., 1993). Co ciekawe, badania nad lokalizacją komórkową U1-70K u *Arabidopsis* wykazały, że w przeciwieństwie do AtU1A i AtU1C, białko to znajduje się tylko w jądrze komórkowym (Lorkovic i in., 2008a) (Ryc. 7). Ponadto, w większości komórek, transfekowanych plazmidem kodującym AtU1-70K zaobserwowano tworzenie struktur, zawierających również białka SR (Lorkovic i in., 2008a, 2008b) (Ryc. 7 i 8).



**Ryc. 8 Wzajemna lokalizacja białek AtU1-70K i AtSRp34 w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

*Dolny panel przedstawia rozkład sygnałów obydwóch białek w sekcjach zaznaczonych liniami (1 i 2); Prawy panel przedstawia nałożenia obydwóch sygnałów; strzałką zaznaczono jąderko; skala równa się 7  $\mu\text{m}$  (Lorkovic i in., 2008b, zmodyfikowane).*

W kompleksie snRNP U1 oprócz AtU1A, AtU1C i AtU1-70K występują również białka pomocnicze, tj. AtPRP39a i b, AtPRP40a i b oraz AtLUC7a, b i rl (Wang i Brendel, 2004). Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek z tej grupy jest AtPRP39a, które zawiera dwie domeny zakonserwowanych 34-aminokwasowych powtórzeń TPR (ang. *tetratricopeptide repeat*), 7 domen HAT (ang. *Half-A-TPR*) oraz bogatą w prolinę i alaninę domenę C-końcową o nieznaną dotąd funkcję (Wang i in., 2007). Sekwencja aminokwasowa domen TPR oraz ich struktura wykazuje znaczne podobieństwo (ponad 55% w przypadku sekwencji) z drożdżowym homologiem tego białka, tj. PRP39p, którego funkcją w dojrzewaniu pre-mRNA jest stabilizacja oddziaływania snRNP U1 z pre-mRNA (Lockhart i Rymond, 1994). Uszkodzenie *PRP39A* u *A. thaliana* skutkuje natomiast późniejszym kwitnieniem, mierzonym jako ilość dni wzrostu i całkowitej liczby liści w momencie kwitnienia (Wang i in., 2007). Mechanizm molekularny leżący u podstaw tych zmian rozwojowych nie został jednakże dotychczas poznany. Jeszcze mniej scharakteryzowane jest białko AtPRP39b, o którym wiadomo jedynie, że zawiera cztery domeny HAT i wykazuje identyczność sekwencji z AtPRP39a na poziomie 37%.

Kolejnymi elementami pomocniczymi kompleksu snRNP U1 są białka AtPRP40. U *Arabidopsis* obecne są trzy geny kodujące członków tej rodziny, tj. *AtPRP40A*, *AtPRP40B* i *AtPRP40C*. Na podstawie podobieństwa z ludzkimi i drożdżowymi komponentami snRNP U1, produkty tylko dwóch pierwszych wymienionych genów zaliczane są do tego kompleksu u roślin (Wang i Brendel, 2004). Charakteryzuje je obecność dwóch domen WW, w których występują zakonserwowane reszty tryptofanowe, odpowiedzialne za wiązanie białek z motywami bogatymi w proliny i/lub elementami zawierającymi fosforylowane seryny i treoniny (Sudol i in., 1995, Chen i Sudol, 1995, Macias i in., 2002). Motywom WW często towarzyszą domeny bogate w fenyloalaninę, tj. FF (Bedford i Leder, 1999). W białkach PRP40 znajdują się cztery takie elementy, które wraz z domenami WW zarówno u roślin, drożdży oraz w komórkach ludzkich są odpowiedzialne za oddziaływanie z C-terminalną domeną (CTD) największej podjednostki RNA Pol II (Morris i Greenleaf, 2000, Allen i in., 2002, Kang i in., 2009). Ponadto, w komórkach ludzkich i/lub drożdżowych wykazano wiązanie białek PRP40 z innymi elementami spliceosomu, tj. elementami snRNP U1 (Snu71, LUC7p), U2 (U2AF65), U5 (Prp8p) oraz białkami wiążącymi się do miejsc rozgałęzienia (Msl5p, BBP, SF1) (Abovich i Rosbash, 1997, Ester i Uetz, 2008, Becerra i in., 2015). Zidentyfikowano również oddziaływania między ludzkimi i/lub drożdżowymi PRP40 i elementami innych

maszynie zaangażowanych w metabolizm RNA, tj. poliadenylacyjnej (CPSF6), kompleksu jądrowego kierującego mRNA do degradacji przez egzozom (ZCCHC8) oraz łączącego egzony (RNPS1) (Colland i in., 2004, Sakashita i in., 2004, Ingham i in., 2005). Rola wymienionych oddziaływań nie jest w większości przypadków jednak poznana. Dotychczas wykazano, że oddziaływania między ludzkim PRPF40B i SF1 oraz U2AF65 bierze udział w regulacji alternatywnego splicingu transkryptów genów związanych z apoptozą (Becerra i in., 2015). Ponadto, sugerowano, że dzięki oddziaływaniu z CTD RNA Pol II, drożdżowy homolog, tj. PRP40p, jest odpowiedzialny za rekrutację spliceosomu do polimerazy i ko-transkrypcyjny splicing (Goldstrohm i in., 2001). Kolejne doniesienia jednakże zaprzeczają, żeby w tym procesie brały udział domeny WW PRP40p, gdyż po ich usunięciu z białka nie zaobserwowano żadnych zmian w splicingu oraz rekrutacji snRNP U1 i U2 do pre-mRNA (Gornemann i in., 2011). Ze względu na trudności w rekrutacji elementów snRNP U5, domeny te miałyby być w zamian zaangażowane w późniejsze etapy budowania spliceosomu. Poza wspomnianą zdolnością do oddziaływania z CTD RNA pol II, funkcja roślinnych białek PRP40 nie jest jeszcze scharakteryzowana.

Białka LUC7 są ostatnią grupą elementów pomocniczych snRNP U1. U *A. thaliana* zidentyfikowano trzy białka z tej rodziny: AtLUC7a, AtLUC7b oraz AtLUC7rl. Podobnie do białek PRP, ich funkcja u roślin nie jest poznana. Drożdżowy homolog, LUC7p, zidentyfikowano dzięki mutacji jego genu, powodującej letalność komórek z dodatkowym brakiem CBC (Fortes i in., 1999). Zarówno ludzki, jak i drożdżowy homolog białek AtLUC7 zawiera w obrębie końca karboksylowego powtórzenia sekwencji aminokwasowych arginina-seryna (RS) i arginina-glutamina (RE). Fragment ten zaangażowany jest w oddziaływania z pierwszymi motywami FF białka drożdżowego PRP40 (Ester i Uetz, 2008). Ponadto, w białkach AtLUC7 obecne są dwa motywy palca cynkowego, z których pierwszy należy do typu C3H (cysteina 3, histydyna), drugi natomiast do C2H2.

Przedstawiony powyżej opis snRNP U1 wskazuje na niewielką wiedzę o tym kompleksie u *A. thaliana*. Ponadto, ciągle niedostępne są informacje dotyczące bezpośrednich oddziaływań między maszyną biogenezy miRNA i splicingową, odpowiedzialnych za regulację dojrzewania pri-miRNA zarówno w komórkach roślinnych jak i zwierzęcych. Ze względu na istotę tej regulacji niezbędne jest pogłębienie wiedzy w tym zakresie.

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na funkcjonalne powiązanie biogenezy miRNA i wycinania intronów znajdujących się w ich prekursorach. Pomimo istotnej roli tej regulacji w funkcjonowaniu organizmów roślinnych nie zidentyfikowano dotychczas białek bezpośrednio w nią zaangażowanych. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było więc odkrycie i zrozumienie interakcji pomiędzy maszyną biogenezy miRNA i spliceosomem. Postawiono hipotezę, że SERRATE, roślinne białko zaangażowane w biogenezę miRNA oraz splicing pre-mRNA, pełni kluczową rolę w molekularnej komunikacji między DCL1, tj. endorybonukleazą, wycinającą miRNA z ich prekursorów, i maszyną odpowiedzialną za usuwanie intronów. Ze względu na kluczową rolę miejsca donorowego intronu w dojrzewaniu pri-miRNA, potencjalnych partnerów SE szukano wśród kompleksu bezpośrednio oddziałującego z tym regionem RNA, tj. wśród snRNP U1. Celem niniejszej rozprawy było także zrozumienie mechanizmu odpowiedzialnego za podwójną rolę SE i kompleksu wiążącego czapkę (CBC, ang. *cap binding complex*) w metabolizmie RNA, tj. biogenezie miRNA i wycinaniu intronów z pierwotnych transkryptów.

Prace badawcze podzielono więc na następujące zadania:

1. Charakterystyka oddziaływania SERRATE z roślinnym kompleksem wiążącym czapkę (AtCBC)
2. Identyfikacja białka/białek snRNP U1, które oddziałują z SERRATE
3. Charakterystyka oddziaływań SERRATE/snRNP U1
4. Analiza roli oddziaływań SERRATE/snRNP U1 w biogenezie miRNA

### 3.1. Materiał roślinny

W trakcie eksperymentów wykorzystywano następujące linie roślin *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia-0:

- Rośliny typu dzikiego (wt)
- Rośliny ze zmutowanym genem kodującym SERRATE (*At2g27100*):

*se-1* – wskutek delecji 7 nukleotydów w roślinach tych powstaje przedwczesny kodon stop (Prigge i Wagner, 2001). Białko jest więc krótsze o 20 aminokwasów od końca karboksylowego, czego skutkiem jest fenotyp o plejotropowym charakterze. Wykazano zaburzenia w trakcie embriogenezy, przyspieszone przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej, ząbkowanie liści, nieprawidłową filotaksję przy kwiatostanie i nadwrażliwość na kwas abscysynowy (Prigge i Wagner, 2001, Yang i in., 2006).

*se-2* – linia z insercją T-DNA, której przybliżona lokalizacja to dziesiąty egzon genu. W trakcie eksperymentów niniejszej pracy zidentyfikowano dokładne miejsce T-DNA, którego obecność również wywołuje plejotropowe zmiany fenotypowe o charakterze poważniejszym w porównaniu z *se-1* (Grigg i in., 2005).

- Rośliny z nadekspresją transgenu, kodującego białko fuzyjne mRFP-Koilina (*At1g13030*) (Collier i in., 2005). Białko to wykorzystywano, jako marker ciał Cajala.

### 3.2. Oligonukleotydy

NAZWA	SEKWENCJA	CEL	
<b>Dwuhybrydowy system drożdżowy</b>			
<b>F_pGADT7 AD</b>	GATGTTTAATACCACTACAATGG ATGAT	Kolonijna PCR	
<b>R_pGADT7 AD</b>	GTGCACGATGCACAGTTGA		
<b>F_pGBKT7</b>	TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAA AGG		
<b>R_pGBKT7</b>	ATAAGAAATTCGCCCGGAATTAG		
<b>F_SE_FL_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGATGGCCGATG TTAATCTTCTC</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej SERRATE ( <i>At2g27100</i> ) (pełnej długości i skróconej wersji białka)	
<b>F_SEΔN_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGGGATTGATGT CATACAAACAATTTATC</i>		
<b>R_SE_FL_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCTTATTACTACAAGCTC CTGTAATCAATAACG</i>		
<b>R_SEΔC_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCTTATTAATAGTTCTGA AAATACAGTTCTTCCCG</i>		
<b>F_SE_FL_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCATGGCCGATGTTAAT CTTCTC</i>		
<b>F_SEΔN_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCGGATTGATGTCATAC AAACAATTTATC</i>		
<b>R_SEΔC_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTATTAATAGTTCTG AAAATACAGTTCTTCCCG</i>		
<b>R_SE_FL_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTATTACTACAAGCT CCTGTAATCAATAACG</i>		
<b>F_U1A_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGATGGAGATGCA AGAGGCTAATC</i>		Amplifikacja sekwencji kodującej AtU1A ( <i>At2g47580</i> )
<b>R_U1A_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCTTATTACTATTTCTTG GCATACGTGATGAG</i>		
<b>F_U1C_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCATGCCGAGGTATTAC TGTGATTATTG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtU1C ( <i>At4g03120</i> )	
<b>R_U1C_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTATTACTACTCATTG CTTTCAGGAGATTCA</i>		
<b>F_U1-70K_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGATGGGAGACTC CGGCGATC</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtU1-70K ( <i>At3g50670</i> )	
<b>R_U1-70K_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGTTATTATCAACG AACATACTCTCGCGATT</i>		
<b>R_U1-70K_PstI</b>	<i>AAAACCTGCAGTTATTATCAACGAAC ATACTCTCGCGATT</i>		
<b>F_PRP39a_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCATGGGTGACAGCGA GGCCA</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP39a ( <i>At1g04080</i> )	
<b>R_PRP39a_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTATTATCAGTAGTA CGTGTTGTAGTACGCTTGAGG</i>		
<b>F_PRP39b_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCATGGGTGACGACGGA GGTTAG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP39b ( <i>At5g46400</i> )	
<b>R_PRP39b_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTATTATCATATAGA ACTGATGGAAGTGTCAGA</i>		

<b>F_PRP40a_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGGCGAATAATCC TCCG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP40a ( <i>At1g44910</i> )
<b>R_PRP40a_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCTTATTACTCCCAAC TTCTCCATCCT</i>	
<b>F_PRP40b_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGGCTAATAACCA TCAATATCCTG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP40b ( <i>At3g19670</i> )
<b>R_PRP40b_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCTTATTAATACCGACC ACATTCTCCATC</i>	
<b>F_LUC7a_EcoRI</b>	<i>CATGCCATGGACGCTATAAGGAA GCAG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtLUC7a ( <i>At3g03340</i> )
<b>R_LUC7a_XhoI</b>	<i>CCCCTCGAGTTATTACTAGTAGCG GTTGTGACGCCTGT</i>	
<b>F_LUC7a_NcoI</b>	<i>CATGCCATGGACGCTATAAGGAA GCAG</i>	
<b>R_LUC7a_EcoRI</b>	<i>CCGGAATTCTTATTACTAGTAGCG GTTGTGACGCCTGT</i>	
<b>F_LUC7b_EcoRI</b>	<i>CCGAATTCATGGACGCTATGAGG AAGCA</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtLUC7b ( <i>At5g17440</i> )
<b>R_LUC7b_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTATTAGTAGCGGTC ATGGCGTCTG</i>	
<b>F_LUC7rl_NdeI</b>	<i>GGAATTCCATATGGATGCTCAGCG AGCTCT</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtLUC7rl ( <i>At5g51410</i> )
<b>R_LUC7rl_BamHI</b>	<i>CGCGGATCCTTACTAGTATTGGCG AATGGGGCTTC</i>	
<b>Nadekspresja białek</b>		
<b>F_pMAL</b>	<i>GACGCGCAGACTAATTCGAG</i>	Kolonijna PCR
<b>R_pMAL</b>	<i>CTGCCATTCGCCATTCAG</i>	
<b>F_SE_XhoI</b>	<i>TCCGCTCGAGATGGCCGATGTTA ATCTTCCTC</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej SERRATE (pełnej długości i skrótowej wersji białka)
<b>R_SE_SalI</b>	<i>ACGCGTCGACTTATTACTACAAGC TCCTGTAATCAATAACG</i>	
<b>F_SE_Core_XhoI</b>	<i>TCCGCTCGAGGGATTGATGTCATA CAAACAATTTATC</i>	
<b>R_SE_Core_SalI</b>	<i>ACGCGTCGACTTATTAATAGTTCTG AAAATACAGTTCTTCCCG</i>	
<b>Analizy mikroskopowe</b>		
<b>F_SE_FL_cacc</b>	<i>CACCATGGCCGATGTTAATCTTCC TC</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej SERRATE (pełnej długości i skrótowej wersji białka)
<b>R_SE_FL</b>	<i>CTACAAGCTCCTGTAATCAATAA CG</i>	
<b>R_SE_FL-STOP</b>	<i>CAAGCTCCTGTAATCAATAACG</i>	
<b>F_SEΔN_NotI</b>	<i>ATAAGAATGCGGCCGCCGATTGA TGTCATACAAACAATTTATC</i>	
<b>R_SE_FL_AscI</b>	<i>TTGGCGCGCCGTTACTACAAGCTC CTGTAATCAATAACG</i>	
<b>F_SE_FL_NotI</b>	<i>ATAAGAATGCGGCCGCCATGGCCG ATGTTAATCTTCTCCG</i>	

<b>R_SEAC_AscI</b>	<i>TTGGCGCGCCGTTAATAGTTCTGA AAATACAGTTCTTCCCG</i>	
<b>F_SE_544_NotI</b>	<i>ATAAGAATGCGGCCGCCATGAATG ATCCTAATGCTCCAG</i>	
<b>F_SE_FL_XhoI</b>	<i>TCCGCTCGAGATGGCCGATGTTA ATCTTCCTCCG</i>	
<b>R_SE_194_XhoI</b>	<i>TCCGCTCGAGGATCCCTTTGAGGA TTTCCACT</i>	
<b>R_SE_2103se1_A scI</b>	<i>TTGGCGCGCCTTAGCTGCGCAGCC GTCTAGGAT</i>	
<b>F_SE_2041se2_m utSTOP</b>	<i>ACCCAACCCTCCTTTTGAAGGTA GCGGGAGATTATTACCTGCCCT TTTCTG</i>	
<b>R_SE_2041se2_ mutSTOP</b>	<i>CAGAAAAGGGGCAGGTAATAAT CTCCCGCTACCTTCAAAGGAGG GTTGGGT</i>	
<b>F_PRP39a_cacc</b>	<i>CACCATGGGTGACAGCGAGGCCA</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP39a
<b>R_PRP39a</b>	<i>GTAGTACGTGTTGTAGTACGCTT GAGG</i>	
<b>F_PRP39b_cacc</b>	<i>CACCATGGTGACGACGGAGGTTA G</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP39b
<b>R_PRP39b</b>	<i>TATAGA ACTGATGGAAGTGTCAG A</i>	
<b>F_PRP40a_cacc</b>	<i>CACCATGGCGAATAATCCTCCG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP40a
<b>R_PRP40a</b>	<i>CTCCCAACTTCTCCATC</i>	
<b>F_PRP40b_cacc</b>	<i>CACCATGGCTAATAACCATCAAT ATCCTG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtPRP40b
<b>R_PRP40b</b>	<i>ATACCGACCACATTCTCC</i>	
<b>F_LUC7rl_NotI</b>	<i>ATAAGAATGCGGCCGCCATGGATG CTCAGCGAGCTCTG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtLUC7rl
<b>R_LUC7rl_AscI</b>	<i>TTGGCGCGCCGGTATTGGCGAAT GGGGCTTC</i>	
<b>F_CBP20_NotI</b>	<i>ATAAGAATGCGGCCGCCATGGCTT CTTTGTTCAAGGAG</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AtCBP20 ( <i>At5g44200</i> )
<b>R_CBP20_AscI</b>	<i>TTGGCGCGCCGTTAATGTAATGG GAATTGAAGTGC</i>	
<b>F_U1A_NotI</b>	<i>ATAAGAATGCGGCCGCCATGGAGA TGCAAGAGGCTAATC</i>	Amplifikacja sekwencji kodującej AU1A
<b>R_U1A_AscI</b>	<i>TTGGCGCGCCGTTTCTTGGCATAC GTGATGAG</i>	
<b>F_UBQ10</b>	<i>CGATTTTCTGGGTTTGATCG</i>	Kolonijna PCR
<b>F_tRFP</b>	<i>ATGGTGTCTAAGGGCGAAGA</i>	
<b>R_tRFP</b>	<i>TTTGTGCCCCAGTTTGCTA</i>	
<b>R_tRFP_seq</b>	<i>GTGCCCTCCATGTACAGCTT</i>	
<b>R_35Sterm</b>	<i>GCTCAACACATGAGCGAAAC</i>	
<b>F_pENTR</b>	<i>GTTTTCCAGTCACGACGTT</i>	
<b>R_pENTR</b>	<i>ACGACTCACTATAGGGGATATCA G</i>	

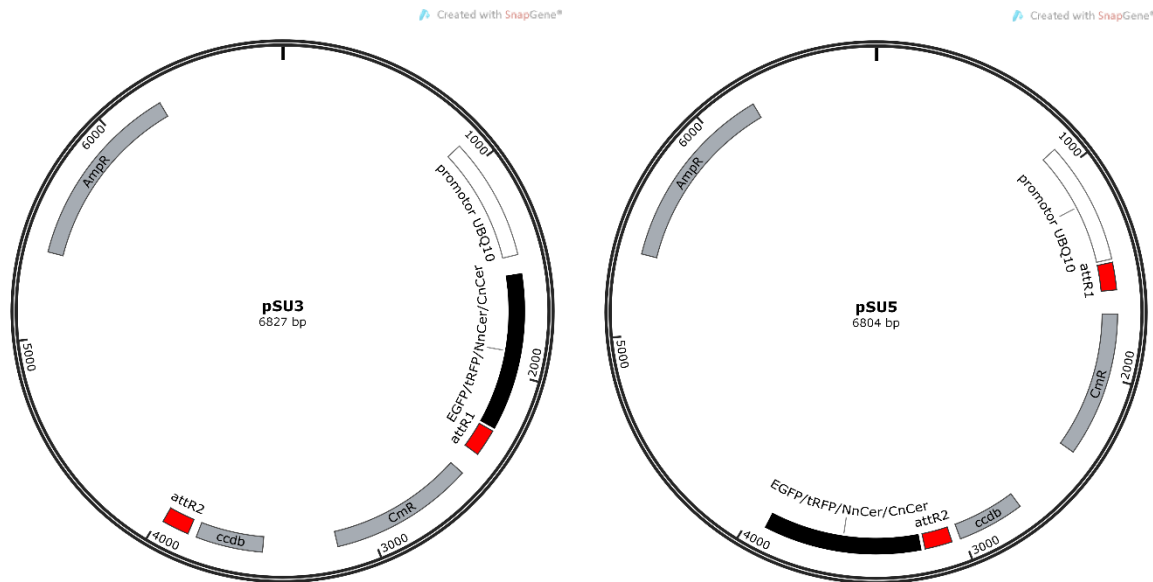
<b>F_GFP</b>	GCATCGACTTCAAGGAGGAC	
<b>R_GFP</b>	GTCCTCCTTGAAGTCGATGC	
<b>PCR w czasie rzeczywistym</b>		
<b>F_SE_rt</b>	GCTATGGACCACCCGATAGA	Poziom mRNA <i>SE</i>
<b>R_SE_rt</b>	ACCATGAGGCCTTTCATCAC	
<b>F_pri-miR159b</b>	TGCTTGGATCTCTAATGCTGTTCA	Poziom pri-miR159b ( <i>At1g18075</i> )
<b>R_pri-miR159b</b>	TCACCCTGCTAAACCCTCCA	
<b>F_pri-miR164c</b>	GTGCGAACACAAATGAAATCGAT	Poziom pri-miR164c ( <i>At5g27807</i> )
<b>R_pri-miR164c</b>	ATTCTGTTCTATCCATTGACGATT GC	
<b>F_pri-miR1888a</b>	TCATTATTGGTGGTATCATTATTG G	Poziom pri-miR1888a ( <i>At5g21100</i> )
<b>R_pri-miR1888a</b>	TGGCTCTGAAACAATCTAAGACC	
<b>F_1888a_FS</b>	CGGCATACGTCAGAAAGGG	Poziom izoformy pri- miR1888a bez intronu
<b>R_1888a_FS</b>	TCGACAATGAACTTGTAAGTGAA AG	
<b>F_1888a_IR</b>	GGAGACACGGTCATTATCCAC	Poziom izoformy pri-miR1888a z pozostawionym intronem
<b>R_1888a_IR</b>	AATTTAGAGTTTATTGAATAACC TGACGTA	
<b>F_GAPDH3</b>	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA	Poziom mRNA GAPDH ( <i>At1g13440</i> )
<b>R_GAPDH3</b>	AAACTTGTGCTCAATGCAATC	
<b>s_snRNAU6</b>	TCATCCTTGCGCAGGGGCCA	Sonda TaqMan do detekcji snRNA U6
<b>SAIL_QRB3</b>	CGCCATGGCATATGCTAGCATGC ATAATTC	Lokalizacja insercji <i>se-2</i>
<b>F_SE_eg10</b>	CACGAAGCTGTTTCATGCTG	

### 3.3. Wektory

Przejsciowa transfekcja protoplastów *A. thaliana*:

- pENTR/D-TOPO (ThermoFisher Scientific)
- Grupa wektorów pSU z promotorem UBQ10, z białkiem fluorescencyjnym GFP lub tagRFP na aminowym (pSU3) lub karboksylowym (pSU5) końcu badanego białka: pSU3-GFP, pSU5-GFP, pSU3-tRFP, pSU5-tRFP – uprzejmie użyte przez dr Michała Michalaka (Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM)

- Grupa wektorów pSU z promotorem UBQ10, z fragmentami białka fluorescencyjnego nCerulean (aminowym - N lub karboksylowym - C) na aminowym (pSU3) lub karboksylowym (pSU5) końcu badanego białka: pSU3-NnCer, pSU5-CnCer – uprzejmie użyzione przez dr Michała Michalaka (Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM)



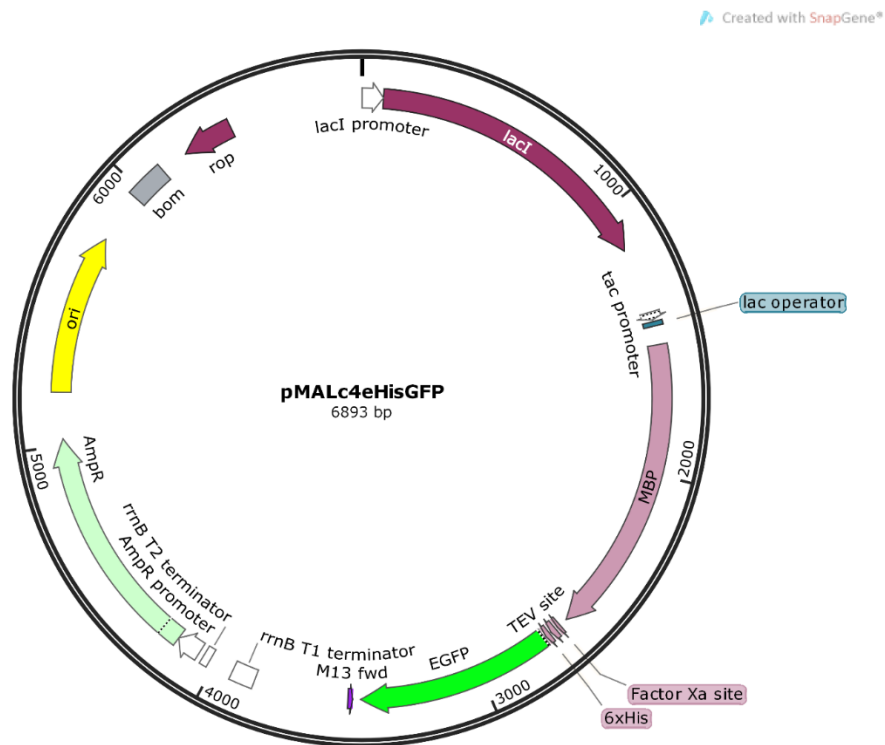
- Grupa wektorów pSAT1, 1A, 4, 4A (Tzfira i in., 2005) z wklonowaną już sekwencją kodującą SERRATE (SE), AtCBP20 i AtCBP80 (uprzednio przygotowane w Zakładzie Ekspresji Genów):  
pSAT1:nEYFP-SE, pSAT1A:SE-nEYFP  
pSAT4:cEYFP-SE, pSAT4A:SE-cEYFP  
pSAT1:nEYFP-AtCBP20, pSAT1A:AtCBP20-nEYFP  
pSAT4:cEYFP-AtCBP20, pSAT4A:AtCBP20-cEYFP  
pSAT1A:AtCBP80-nEYFP

Dwuhybrydowy system drożdżowy:

- pGADT7 AD i pGBKT7 (Clontech)

## Nadekspresja białek w *Escherichia coli*

- pMALc4e zmodyfikowany poprzez dodanie metki 6xHis i miejsca cięcia przez proteazę TEV - uprzejmie użyzony przez dr Marca-Davida Ruepp'a (Instytut Biologii Komórki, Uniwersytet w Bern, Szwajcaria)



### 3.4. Odczynniki i roztwory

ACE	Procter & Gamble
adenina	Sigma Aldrich
agaroza	Prona
akrylamid	Sigma Aldrich
albumina wołowa (BSA)	Sigma Aldrich
aminokwasy	Sigma Aldrich
Amistar	Syngenta
antybiotyki	Bioshop
azotan potasu	Sigma Aldrich
azotan wapnia	Sigma Aldrich
baktotrypton	Difco Laboratories
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad
błękit bromofenolowy	Sigma Aldrich
bromek etydyny	Bio-Rad
$\beta$ -merkaptoetanol	Sigma Aldrich
chlorek kobaltu	Sigma Aldrich
chlorek manganu	Merck
chlorek wapnia	Sigma Aldrich
chloroform	Chempur
COOMASSIE® Brilliant Blue G-250	Serva
dietylopirowęglan (DEPC)	Promega
diwodorofosforan potasu	Amersham
dodecylosiarczan sodu (SDS)	USB
EDTA	Sigma Aldrich
EGTA	Sigma Aldrich
etanol 96%	POCH Gliwice
ekstrakt drożdżowy	Difco Laboratories
fenol	POCH Gliwice
glicerol	Sigma Aldrich
glicyna	Sigma Aldrich

glukoza	Sigma Aldrich
izopropanol	Chempur
izopropylo- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	Boehringer Mannheim
kwask borowy	Sigma Aldrich
kwask solny	POCH Gliwice
ksylencjanol	Sigma Aldrich
mocznik	Sigma Aldrich
nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich
octan litu	Sigma Aldrich
octan sodu	Sigma Aldrich
Orange G	Sigma Aldrich
PEG 3350	Sigma Aldrich
PEG 4000	Sigma Aldrich
sacharoza	Sigma Aldrich
siarczan cynku	Sigma Aldrich
siarczan magnezu	Sigma Aldrich
siarczan miedzi	Sigma Aldrich
siarczan żelaza	Sigma Aldrich
Tris	Sigma Aldrich
Triton X-100	USB

### Enzymy

DNaza Turbo (2U/ $\mu$ l)	Ambion
Odwrotna transkryptaza Super Script III (20U/ $\mu$ l)	Invitrogen
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific
Gateway LR Clonase II	Enzyme Mix ThermoFisher Scientific
RNaza A (10mg/ml)	Sigma Aldrich
DreamTaq polimeraza DNA (5U/ $\mu$ l)	ThermoFisher Scientific
Pfu polimeraza DNA (2,5U/ $\mu$ l)	ThermoFisher Scientific
T4 DNA ligaza (5U/ $\mu$ l)	Promega

Enzymy restrykcyjne (10U/μl)	ThermoFisher Scientific
Enzymy restrykcyjne Fast Digest	ThermoFisher Scientific
SYBR® Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific
Inhibitor rybonukleaz RNasin®	Promega
Inhibitor proteaz Complete Mini EDTA-free	Roche

#### Markery molekularne

Gene Ruler™ 1kb Plus	ThermoFisher Scientific
Gene Ruler™ 100bp Plus	ThermoFisher Scientific
PageRuler™ Plus Prestained	ThermoFisher Scientific
PageRuler™ Prestained	ThermoFisher Scientific

#### Zestawy odczynników

GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich
GelElute Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma Aldrich
GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup	ThermoFisher Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep	ThermoFisher Scientific
GeneJET Plasmid Maxiprep	ThermoFisher Scientific
Direct-zol RNA Mini Prep Kit	Zymo Research
TnT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System	Promega
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
TaqMan® MicroRNA & Non-coding RNA Assay	ThermoFisher Scientific
Trizol® Reagent	Invitrogen

#### Przeciwciała

królicze anty-SERRATE	Agrisera, AS09 532
mysie anty-aktyna	β-actin, MP Biomedicals, 08691001
anty-królicze koniugowane z HRP	Agrisera, AS09 602
anty-mysie koniugowane z HRP	Santa Cruz Biotechnology, sc-2005

### 3.5. Podstawowe materiały do hodowli bakterii

#### Pożywka LB

1 % baktotrypton

0,5 % ekstrakt drożdżowy

1 % NaCl

W celu przygotowania pożywki stałej, mieszaninę suplementowano agarą o stężeniu końcowym 1,5% i antybiotykiem po ostudzeniu pożywki do 50 °C

#### Antybiotyki

Antybiotyk	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
<b>Ampicylina</b>	50 mg/ml	50 µg/ ml
<b>Kanamycyna</b>	50 mg/ml	50 µg/ ml
<b>Chloramfenikol</b>	34 mg/ml	34 µg/ ml

### 3.6. Materiały do hodowli roślin

#### Roztwór do zasilania roślin (1000ml)

roztwór KNO<sub>3</sub> 5,0 ml

R III 2,5 ml

roztwór KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 ml

roztwór MgSO<sub>4</sub> 2,0 ml

roztwór Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2,0 ml

roztwór mikroelementów 1,0 ml

#### *roztwór KNO<sub>3</sub> (100 ml)*

10 % (w/v) KNO<sub>3</sub>

sterylizowano przez autoklawowanie (121°C, 1 atm., 20 minut)

#### *roztwór KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 ml)*

17,42 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 5,6 ustalono przy użyciu KOH

sterylizowano przez autoklawowanie (121°C, 1 atm., 20 minut)

*roztwór MgSO<sub>4</sub> (100 ml)*

24,65 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>

przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,22μm, Millipore)

*roztwór Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 ml)*

23 % (w/v) Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,22μm, Millipore)

*R III*

0,75 % (w/v) Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O dokładnie rozpuszczono

0,56 % (w/v) FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O rozpuszczono i zagotowano (nie autoklawowano)

*roztwór mikroelementów*

70 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (433 mg/100 ml)

14 mM MnCl<sub>2</sub> (278 mg/100 ml)

0,5 mM CuSO<sub>4</sub> (8 mg/100ml)

1 mM ZnSO<sub>4</sub> (16,2 mg/100 ml)

0,2 mM NaMoO<sub>4</sub> (3,7 mg/100ml)

10 mM NaCl (58,4 mg/100 ml)

0,01 mM CoCl<sub>2</sub> (0,1 mg/100ml)

przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,22μm, Millipore)

### **3.7. Materiały do analiz białkowych**

#### Nadekspresja białek

Szczep *Escherichia coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIL (Agilent Technologies) – komórki tego szczepu zawierają dodatkowe kopie genów *argU*, *ileY* i *leuW* tRNA. Umożliwiają produkcję białek z wykorzystaniem plazmidów z promotorem T7

#### *Bufor do sonikacji i wiązania*

20 mM Tris-HCl, pH 7,4

0.2 mM NaCl

1 mM EDTA

0,5% Triton X-100

Inhibitory proteaz (Complete Mini EDTA-free protease inhibitors, Roche)

*Bufor fosforanowy*

28 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

72 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

250 mM KCl

0.5% Triton X-100

Inhibitory proteaz (Complete Mini EDTA-free protease inhibitors, Roche)

Elektroforeza białkowa

*30% roztwór akrylamid:bisakrylamid (100ml) (30%AA)*

Akrylamid 30g

Bisakrylamid 0,8g

Woda dejonizowana MiliQ 100ml

*5% żel poliakrylamidowy zagęszczający*

30% AA 850µl

1M Tris pH 6,8 626µl

Woda dejonizowana MiliQ 3,496ml

20% SDS 25µl

10% APS 25 µl

TEMED 5µl

*14% żel poliakrylamidowy rozdzielający*

30% AA 4,667ml

1M Tris pH 8,6 3,68ml

Woda dejonizowana MiliQ 1,565ml

20% SDS 50µl

10% APS 30µl

TEMED 5µl

*Obciążacz do białek 6xSSB*

0,375M Tris-HCl

60% glicerol

12% SDS

0,6M  $\beta$ -merkaptoetanol

0,06% błękit bromofenolowy

*Obciążacz do białek 2xSSB*

0,06M Tris-HCl

5% glicerol

2% SDS

4%  $\beta$ -merkaptoetanol

0,0025% błękit bromofenolowy

*Bufor Laemmli, 10x*

250mM Tris-HCl pH 8,3

1,92M glicyna

1% SDS

Roztwory do odwadniania żeli poliakrylamidowych

*Roztwór I*

50% metanol

10% kwas lodowy octowy

*Roztwór II*

7% kwas octowy

7% metanol

1% glicerol

Roztwór do wybarwiania białek w żelu poliakrylamidowym

COOMASSIE® Brilliant Blue G-250 80 mg

Woda dejonizowania MiliQ 1L

Po rozpuszczeniu dodawano 3 ml kwasu solnego i mieszano przez 1 godzinę

### Bufor do ekstrakcji białek z materiału roślinnego

100 mM Tris-HCl pH 7,5

10% glicerol

5 mM EDTA

5 mM EGTA

150 mM NaCl

0,75% TritonX-100

0,05% SDS

1 mM DTT

Inhibitory proteaz (Complete Mini EDTA-free protease inhibitors, Roche)

### Bufor do transferu, 5x

125 mM Tris pH 8,3

0,96 M Glicyna

0,5% SDS

### Bufor TBST

5mM Tris pH 7,6

0,7% NaCl

0,01% Tween-20

## **3.8. Izolacja i transfekcja protoplastów *A. thaliana***

### Roztwór enzymów trawiących

1,2% (w/v) Cellulaza Onozuka R10 *Trichoderma viride* (Serva; 1 U/mg)

0,4% (w/v) Macerozym R-10 z *Rhizopus* sp. (Serva)

0,4 M mannitol

20 mM KCl

20 mM MES pH 5,7

Po rozpuszczeniu składników roztwór filtrowano z wykorzystaniem filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 µm.

#### Roztwór PEG

40% PEG 4000

0,2 M mannitol

0,1 M CaCl<sub>2</sub>

Po rozpuszczeniu składników roztwór filtrowano z wykorzystaniem filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,45 µm.

#### W5

154 mM NaCl

125 mM CaCl<sub>2</sub>

5 mM KCl

2 mM MES pH=5.7

Po rozpuszczeniu składników roztwór filtrowano z wykorzystaniem filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 µm.

#### MMg

0,4 M mannitol

15 mM MgCl<sub>2</sub>

4 mM MES

Po rozpuszczeniu składników roztwór filtrowano z wykorzystaniem filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 µm.

#### W1

0,5 M mannitol

20 mM KCl

4 mM MES

Po rozpuszczeniu składników roztwór filtrowano z wykorzystaniem filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 µm.

### **3.9. Materiały do analiz z wykorzystaniem drożdży**

W pracy wykorzystywano komórki *Saccharomyces cerevisiae*, szczep Matchmaker Gold (Clontech).

## Hodowla drożdży

### *Pożywka YPDA (1L)*

Pepton 20g

Ekstrakt drożdżowy 10g

Adenina 30mg

40% sterylny roztwór glukozy 50ml (stężenie końcowe 2%; dodawany po autoklawowaniu pozostałych składników)

Woda dejonizowana MiliQ

Dla pożywki stałej: dodatkowo agar 20g

### *Pożywka syntetyczna (SD) (800ml)*

Yeast nitrogen base without aminoacids (Sigma Aldrich) 5,36g

DROP-OUT 10x 80ml

40% sterylny roztwór glukozy 40ml (stężenie końcowe 2%; dodawany po autoklawowaniu pozostałych składników)

Woda dejonizowana MiliQ

Dla pożywki stałej: dodatkowo agar 16g

### *DROP-OUT, 10x (1L)*

L-Adenina 200mg

L-Arginina HCl 200mg

L-Histydyna HCl monohydrat 200mg

L-Izoleucyna 1000mg

L-Lizyna HCl 300mg

L-Metionina 200mg

L-Fenyloalanina 500 mg

L-Treonina 2000mg

L-Tyrozyna 300mg

L-Uracyl 200mg

L-Walina 1500mg

Woda dejonizowana MiliQ

### *Pożywki selekcyjne*

DDO (SD-Leu-Trp) - brak L-leucyny i L-tryptofanu - wstępna selekcja na obecność plazmidów

QDO (SD-Leu-Trp-His-Ade) - brak L-leucyny, L-tryptofanu, L-histydyny, L-adeniny - selekcja na istnienie oddziaływań między białkami

QDO/X/A (SD-Leu-Trp-His-Ade + X- $\alpha$ Gal + Aureobazydyna A) - brak L-leucyny, L-tryptofanu, L-histydyny, L-adeniny i obecność w pożywce X- $\alpha$ Gal i Aureobazydyny A - selekcja na istnienie oddziaływań między białkami

### Aureobazydyna A – roztwór wyjściowy

Przygotowanie: do uzyskania roztworu wyjściowego o stężeniu 500  $\mu$ g/ml rozpuszczono 1 mg Aureobazydyny A (Clontech) 2 ml etanolu 96%. Powstały roztwór przechowywano w 4°C.

W celu przygotowania 500 ml pożywki stałej SD dodawano 125 $\mu$ l roztworu wyjściowego Aureobazydyny A.

### X- $\alpha$ Gal – roztwór wyjściowy

Przygotowanie : rozpuszczono X- $\alpha$ Gal (Clontech) do stężenia końcowego 20mg/ml w rozpuszczalniku DMF (dimetylfornamid, Fluka). Roztwór przechowywano w temperaturze -20°C.

W celu przygotowania 500 ml pożywki stałej SD dodawano 1ml roztworu wyjściowego X- $\alpha$ Gal do uzyskania stężenia 40 ng/ml.

### Transformacja komórek drożdżowych

#### *TE 10x*

100mM Tris-HCl pH 7,5

10mM EDTA pH 8,0

#### *Roztwór TE/LiAc (10ml)*

TE 10x 1,1ml

1M LiAC 1,1ml

Woda dejonizowana MiliQ 7,8ml

*Roztwór PEG/LiAc*

TE 10x 1ml

1M LiAC 1ml

PEG 50% 3350 8ml

*Carrier DNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)*

DNA, sól sodowa z spermy łososia (Amersham) 100mg

Woda dejonizowana MiliQ 10ml

### 4.1. Hodowla roślin

Rośliny *A. thaliana* hodowano po 3-dniowym procesie stratyfikacji nasion w 4°C w doniczkach torfowych 'Jiffy-7 42 mm' w komorze hodowlanej (Conviron) z następującymi stałymi warunkami wzrostu: 22°C, 70% wilgotności, naświetlenie 150-200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  (16 godzin światła/8 godzin ciemności). Po dwóch tygodniach, raz na tydzień rośliny podlewano dodatkowo roztworem zasilającym.

### 4.2. Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych

#### Izolacja RNA i przygotowanie cDNA

Całkowite RNA izolowano stosując zestaw odczynników Direct-zol RNA Mini Prep Kit (Zymo Research), a następnie traktowano DNazą (ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta w celu usunięcia zanieczyszczeń genomowym DNA. 3  $\mu\text{g}$  tak przygotowanego preparatu RNA po potwierdzeniu czystości i integralności w żelu agarozowym przepisywano na cDNA prowadząc reakcję odwrotnej transkrypcji. Stosowano w tym celu enzym SuperScript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) i starter oligo(dT)18 (ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta enzymu.

W celu przygotowania matrycy cDNA specyficznej dla miRNA, prowadzono reakcję z wykorzystaniem 10 ng całkowitego RNA przygotowanego jak powyżej i odwrotnej transkryptazy MultiScribe™ Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta enzymu. Analogicznie przygotowano matrycę z wykorzystaniem specyficznego startera dla cząsteczki snRNA U6, którą później wykorzystywano jako referencję.

#### Przygotowanie konstruktów wykorzystywanych w pracy

Sekwencje kodujące analizowanych w pracy białek amplifikowano przy zastosowaniu polimerazy Pfu (ThermoFisher Scientific). Wykorzystywano w tym celu matrycę cDNA przygotowaną z RNA wyizolowanego z 3-tygodniowych roślin i startery specyficzne dla danej sekwencji. Startery te zawierały dodatkowo nukleotydy będące miejscem rozpoznawanym przez konkretny enzym restrykcyjny. W trakcie wyboru temperatury przyłączenia starterów i programu amplifikacji stosowano się do zaleceń

producenta enzymu. Listę wszystkich oligonukleotydów stosowanych w pracy zamieszczono w tabeli w rozdziale Materiały.

Po amplifikacji sekwencji kodującej produkt oczyszczano z wykorzystaniem zestawu odczynników GenElute PCR Clean Up (Sigma Aldrich) lub GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific), poddawano trawieniu restrykcyjnemu, rozdzielano w 1% żelu agarozowym i przy pomocy zestawu odczynników (GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup lub GenElute Gel Extraction Kit) oczyszczano produkt znajdujący się na odpowiedniej wysokości. Tak przygotowany fragment DNA ligowano z wektorem przygotowanym przez trawienie tymi samymi enzymami restrykcyjnymi i defosforylację końców. Ligację prowadzono przez trzy godziny w temperaturze pokojowej stosując ligazę T4 DNA (ThermoFisher Scientific). Następnie chemicznie kompetentne komórki *E. coli* szczep DH5 $\alpha$  transformowano mieszaniną ligacyjną i posiewano na stałą pożywkę LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku.

Konstrukty do analiz mikroskopowych przygotowano z wykorzystaniem systemu Gateway<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific). W pierwszej kolejności namnożone sekwencje kodujące badanych białek ligowano z wektorem pENTR/D-TOPO, wykorzystując miejsca restrykcyjne NotI i AscI lub 5-minutową reakcją topoizomerazy I, zgodnie z zaleceniami producenta systemu. Następnie stosowano enzym Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) w celu przeniesienia wstawek do wektorów docelowych, którymi transfekowano protoplasty *A. thaliana*. Stosowano następujące warunki reakcji: 150 ng plazmidu pENTR, 150 ng plazmidu docelowego, 1  $\mu$ l enzymu i TE, pH 8.0 do objętości 5  $\mu$ l. Reakcję prowadzono w 30 °C przez 1 godzinę, po czym transformowano nią komórki *E. coli* - szczep DH5 $\alpha$ .

W celu przygotowania konstruktów odpowiadających wersji białka SE w mutancie *se-1* i *se-2* w plazmidach z sekwencją kodującą pełnej długości białko wprowadzono kodon stop po 2043 (*se-2*) lub po 2103 (*se-1*) nukleotydzie. Stosowano zestaw odczynników do mutagenyzy QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Reakcje prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

W kolejnym etapie prowadzono kolonijną reakcję PCR z zastosowaniem polimerazy Dream Taq (ThermoFisher Scientific) i starterów przyłączających się do okalających miejsce insercji sekwencji wektora. Amplifikację prowadzono stosując się

w trakcie wyboru temperatury przyłączenia starterów i programu amplifikacji do zaleceń producenta.

Po rozdzieleniu produktów kolonijnej reakcji PCR w żelu agarozowym wybierano kolonie zawierające wstawkę o odpowiedniej długości i orientacji, prowadzono ich całonocną hodowlę w 37°C i izolowano plazmid. Tak uzyskane konstrukty następnie sekwencjonowano w celu wykluczenia mutacji.

#### *Transformacja bakterii Escherichia coli DH5α i BL21-Codon Plus(DE3)RIL*

Komórki bakterii *Escherichia coli* po wprowadzeniu w stan kompetencji były przechowywane w zamrażarce, w temperaturze -80 °C w 1,5 ml probówkach (Eppendorf). Przed przystąpieniem do transformacji, komórki rozmrażano w lodzie przez 20 minut. Następnie do rozmrożonych komórek dodawano 10 µl mieszaniny ligacyjnej lub 5 µl reakcji LR Clonase, mieszano i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Po 30 minutach inkubacji mieszaninę poddawano stresowi termicznemu w temperaturze 42 °C przez 1 minutę i ponownie umieszczano w lodzie na 2 minuty. Następnie dodawano 300 µl płynnej pożywki LB, hodowano przez 1,5 godziny w 37 °C na termobloku z wytrząsaniem 350rpm i posiewano na płytki ze stałą pożywką LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. Płytki następnie umieszczano w cieplarni 37 °C na 16 godzin.

#### *Hodowla transformowanych komórek Escherichia coli DH5α niosących insert w płynnej pożywce LB*

Po wyselekcjonowaniu odpowiednich kolonii bakterii *Escherichia coli* zaszczipiano nimi 5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku i hodowano z wytrząsaniem 200 rpm przez 16 godzin. Po tym czasie przystępowano do izolacji plazmidów, którą prowadzono zgodnie z protokołem producenta zestawu odczynników GenElute™HP plazmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific).

#### PCR w czasie rzeczywistym

##### *Reakcje z wykorzystaniem matrycy uzyskanej przy zastosowaniu oligo(dT)18*

Reakcje prowadzono z wykorzystaniem odczynnika Power SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) i aparatu 7900HT Fast Real-Time PCR System lub QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Mieszanina

reakcyjna (10 µl) składała się z: 5 µl odczynnika 2X Power SYBR Green PCR MasterMix, 1 µl matrycy cDNA oraz pary specyficznych starterów (200 nM każdy).

Stosowano następujący profil termiczny:

<b>Etap</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Ilość cykli</b>
<b>Denaturacja wstępna</b>	95 °C	10 min	1
<b>Denaturacja</b>	95 °C	15 s	40
<b>Przyłączanie starterów i amplifikacja</b>	60 °C	1 min	
<b>Krzywa topnienia</b>	95 °C	15s	1
	60 °C - 95 °C	30 min	1

Wydajność amplifikacji starterów wyliczano na podstawie wyników uzyskanych z serii 10-krotnych rozcieńczeń matrycy. Wyznaczano w tym celu krzywą regresji na podstawie uzyskanych punktów pomiarowych i współczynnik nachylenia prostej, który następnie podstawiano do wzoru:

$E = ((10^{-1/\text{współczynnik nachylenia}}) - 1) * 100$ , gdzie E to wydajność amplifikacji starterów.

Wykorzystywano startery o wydajności min. 95%, a w przypadku porównywania produktów, które uzyskiwano przy pomocy dwóch różnych par starterów, różnica wydajności między tymi dwoma parami nie przekraczała 2%. Ponadto, na podstawie krzywej dysocjacji odrzucano wyniki analiz, w których dochodziło do amplifikacji więcej niż jednego produktu w jednej reakcji.

Poziom ekspresji wyliczano stosując metodę  $2^{-\Delta Ct}$ , natomiast względny poziom ekspresji przy zastosowaniu metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . W celu normalizacji danych wykorzystywano poziom mRNA GAPDH (*At1g13440*), który oznaczano jednocześnie z badanymi transkryptami. W celu analizy istotności różnic między próbami kontrolnymi i badanymi, stosowano Test t-Studenta oprogramowania Microsoft Excel (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Analizy te prowadzono z wykorzystaniem wartości poziomu ekspresji genów, uzyskanych metodą  $2^{-\Delta Ct}$ .

Wydajność splicingu analizowano wyliczając poziom każdej izoformy splicingowej w próbie badanej względem próby kontrolnej, a następnie określając stosunek

porównywanych izoform, przyjmując ich sumę za 100%. Każdą analizę wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych z wykorzystaniem oprogramowania SDS 2.4 lub QuantStudio™ Real-Time PCR. Odchylenie standardowe, wyliczone w programie Microsoft Excel przedstawiono na wykresach w postaci słupków błędów.

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej różnic wydajności splicingu między badanymi próbkami wykorzystano test t-Studenta oprogramowania Microsoft Excel (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Analiz statystycznych i obliczeń odchylenia standardowego nie wykonywano w przypadku danych przedstawiających względny poziom ekspresji, ze względu na nieodpowiedni dla takich analiz zbiór pomiarów w próbce kontrolnej (1,1,1).

#### Reakcje służące detekcji miRNA

Reakcje prowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników do detekcji krótkich RNA (TaqMan® MicroRNA & Non-coding RNA Assay (ThermoFisher Scientific) i aparatu 7900HT Fast Real-Time PCR System lub QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific), zgodnie z protokołem producenta zestawu. Stosowano następujący profil termiczny:

<b>Etap</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Ilość cykli</b>
<b>Aktywacja UNG (glikozylazy N-uracylu)</b>	50 °C	2 min	1
<b>Denaturacja wstępna</b>	95 °C	10 min	1
<b>Denaturacja</b>	95 °C	15 s	45
<b>Przyłączenie sondy i amplifikacja</b>	60 °C	1 min	

Względny poziom ekspresji wyliczano stosując metodę  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . W celu normalizacji danych wykorzystywano poziom snRNA U6, który oznaczano jednocześnie z badanymi miRNA.

### 4.3. Eksperymenty z wykorzystaniem białek

#### Nadekspresja białek w *Escherichia coli* BL21-Codon Plus(DE3)RIL

1. 5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (50 µg/µl) i chloramfenikolu (34 µg/µl) zaszczipiano jedną kolonią komórek i inkubowano w 37 °C z wytrząsaniem przez całą noc (kultura wstępna).
2. Po całonocnej hodowli kulturę wstępną rozcieńczano w świeżej płynnej pożywce LB z dodatkiem ampicyliny (50 µg/µl) i chloramfenikolu (34 µg/µl) w stosunku 1:1000 i prowadzono hodowlę do uzyskania zawiesiny o OD<sub>600</sub>=0,5-0,6.
3. W celu indukcji nadekspresji dodawano 1 M IPTG do uzyskania ostatecznego stężenia 0,4 mM i prowadzono hodowlę w warunkach testowych na małą skalę (50 ml) lub ostatecznie w optymalnych dla każdego białka (1 L) (tabela 2).
4. Po odpowiednim czasie hodowlę wirowano przez 10 min w 4°C z prędkością 6000g, odrzucano supernatant i przystępowano bezpośrednio do sonikacji komórek lub zamrażano osad w -20 °C.

Tabela 2 Optymalne warunki nadekspresji białek SERRATE i GFP w fuzji białkiem wiążącym maltozę (MBP) w *E.coli*

<b>Białko</b>	<b>Temperatura prowadzenia nadekspresji</b>	<b>Czas prowadzenia nadekspresji</b>
<b>MBP-SERRATE (1-720 aa)</b>	20°C	16 godzin
<b>MBP-SERRATE (194-543 aa)</b>	37°C	2 godziny
<b>MBP-GFP</b>	37°C	2 godziny

5. Komórki zawieszano w buforze do sonikacji i wiązania, sonikowano (15 cykli: 30 s ON i 30 s OFF), a następnie wirowano przez 15 min w 4°C z prędkością 14000g lub 30 min w 4°C z prędkością 5000g (dla objętości powyżej 2ml). Klarowny supernatant (frakcja rozpuszczalna) oraz uzyskano osad zawieszony następnie w wyjściowej objętości ekstraktu bakteryjnego (frakcja nierozpuszczalna)

wykorzystywano bezpośrednio w dalszych etapach badań lub przechowywano w -20 °C do miesiąca, po uprzednim zamrożeniu w ciekłym azocie.

#### Translacja *in vitro*

Translację prowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników TnT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System (Promega) i radioaktywnie znakowanej metioniny [<sup>35</sup>S] (HARTMANN ANALYTIC) zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Po 90 minutach dodawano do reakcji 1 μl roztworu RNazy A (20mg/ml) w celu degradacji niewykorzystanych wyznakowanych tRNA i inkubowano przez kolejne 30 min w 30°C. Próby następnie bezpośrednio wykorzystywano lub przechowywano w -20°C do tygodnia, po uprzednim zamrożeniu w ciekłym azocie.

#### Pull down

Frację rozpuszczalną ekstraktów bakteryjnych zawierających rekombinowane białko wiązano do złoża amylozowego (New England BioLabs) w 4 °C przez całą noc na rotatorze (2rpm), po czym złożo przemywano trzy razy buforem do sonikacji i wiązania (10 min każde płukanie, 8rpm, wirowanie 1000g). Następnie do takich prób dodawano 20 μl reakcji translacji *in vitro*, 300 μl buforu fosforanowego i inkubowano w 4°C przez 2 godziny na rotatorze (2rpm). Po wiązaniu złożo płukano cztery razy buforem fosforanowym i kompleksy białkowe wymywano poprzez dodatek 100 μl 10mM maltozy, inkubację w 4 °C przez 20 min i odwirowanie przez 1 min przy maksymalnych obrotach. Białka następnie rozdzielano w 14% żelu poliakrylamidowym, który poddawano odwadnianiu (60 min w roztworze I i 5 min w roztworze II), suszeniu i ekspozycji. Detekcję prowadzono z wykorzystaniem czytnika FLA-5000 (FUJIFILM).

#### Elektroforeza białek

Elektroforezę prowadzono w 14% poliakrylamidowym żelu rozdzielającym (30:0,8) po uprzednim zatężeniu prób w 5% żelu zagęszczającym (30:0,8). Rozdział przy natężeniu 25mA (na jeden żel) w buforze Laemmli kończono w momencie wyjścia barwnika z żelu lub w momencie odpowiednim dla rozdzielenia badanych w danym momencie białek.

### Ekstrakcja białek z materiału roślinnego

1. Do 100-200mg tkanki roślinnej dodawano 200-300µl buforu ekstrakcyjnego
2. Próbkę wytrząsano w termocyklerze przez 60 min w temp 4 °C przy 1000-1100 rpm
3. Próbkę wirowano przez 15-20 min w temperaturze 4 °C przy 20000g.
4. Ponownie wirowano i zbierano supernatant (próby wirowano do uzyskania czystego supernatantu).
5. W uzyskanych ekstraktach mierzono stężenie białek wykorzystując krzywą BSA i odczynnik Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, który rozcieńczano wodą w stosunku 1:4. Do pomiarów przygotowano następujące próby:
  - a. Próby badane: 20 µl ekstraktu roślinnego + 980 µl rozcieńczonego odczynnika
  - b. Próby do krzywej wzorcowej: 20 µl roztworu wzorcowego (0,2; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0 mg/ml) + 980 µl rozcieńczonego odczynnika

Tak przygotowane próby następnie inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej i mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm. Następnie sporządzano krzywą standardową i wyliczono stężenia za pomocą równania prostego.

6. Próby zamrażano za pomocą ciekłego azotu i przechowywano w -80 °C.

### Transfer białek na membranę

1. Po wyjęciu żelu z szybki oddzielano żel zagęszczający i korek.
2. Membranę aktywowano w metanolu przez 15 sekund, po czym inkubowano po 2 min w wodzie dejonizowanej i buforze do transferu.
3. Na trzy warstwy bibuły Whatman nakładano zaktywowaną membranę, przykrywano trzema kolejnymi warstwami bibuły i rolowano w celu usunięcia pęcherzyków powietrza
4. Transfer prowadzono przy napięciu 15V przez 60min.

### Western blot

1. Po zakończeniu procesu transferu, membranę blokowano 5% mlekiem odtłuszczonym rozpuszczonym w TBST przez godzinę w temperaturze pokojowej.
2. Po blokowaniu, membranę inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała I-rzędowego (1:2000 anty-SE i 1:20000 anty-aktyna), sporządzonego w 2% roztworze mleka odtłuszczonego.

3. Membranę następnie czterokrotnie płukano buforem TBST (po 10 min) i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała II-rzędowego (1:10000), koniugowanego z peroksydazą chrzanową.
4. Po inkubacji membranę czterokrotnie płukano buforem TBST i nakładano na 5 min substrat Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (400  $\mu$ l odczynnik A + 400  $\mu$ l odczynnik B, uprzednio zmieszane)
5. Detekcję prowadzono przy zastosowaniu urządzenia G-Box i oprogramowania Gene-Sys.

#### **4.4. Izolacja i transfekcja protoplastów *A. thaliana***

Stosowano protokół oparty na procedurach opublikowanych przez Wu i in., 2009, Bucherl i in., 2010, z modyfikacjami.

Wszystkie czynności wykonywano w temperaturze pokojowej.

1. Liście 3-tygodniowych roślin *A. thaliana* po uprzednim usunięciu dolnej epidermy z wykorzystaniem taśmy klejącej (Wu i in., 2009) inkubowano przez 30 min w roztworze enzymów trawiących w szalce Petriego na platformie z wytrząsaniem horyzontalnym (55rpm).
2. Po tym czasie liście usuwano a uzyskaną mieszaninę komórkową inkubowano przez kolejne 15 min w celu dotrawienia uwolnionych protoplastów.
3. Mieszaninę protoplastów następnie wirowano przez 3 min w próbówce typu falcon o pojemności 50 ml z prędkością 200g.
4. Zwirowane protoplasty płukano następnie trzykrotnie w roztworze W5 stosując parametry wirowania z pkt. 3
5. Po ostatnim wirowaniu protoplasty zawieszano w 1 ml roztworu MMg i następnie dodawano w porcjach po 100  $\mu$ l do plazmidów (5  $\mu$ g) przygotowanych uprzednio w 2 ml probówkach.
6. Do mieszaniny protoplastów i DNA dodawano 100  $\mu$ l roztworu PEG i delikatnie mieszano. Po 5 minutach w celu zatrzymania reakcji transfekcji dodawano 450  $\mu$ l roztworu W5 i wirowano przez 3 min z prędkością 300g. Po odebraniu supernatantu protoplasty zawieszano w 300  $\mu$ l roztworu W1 i inkubowano w ciemności przez 7 lub 16 godzin przed analizami mikroskopowymi.

#### 4.5. Mikroskopia konfokalna

Analizy lokalizacji komórkowej białek i odtwarzania struktury EYFP oraz nCerulean prowadzono przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu konfokalnego (Nikon A1Rsi) wyposażonego w obiektyw 40x/1,25 o imersji wodnej. W celu wzbudzenia fluorescencji stosowano laser argonowy o długości fali 488 nm (EGFP), 514 nm (YFP) oraz lasery diodowe o długości fali 440 nm (nCerulean) i 561 nm (tagRFP). Emisję fluorescencji rejestrowano w następującym zakresie spektralnym: 482/35 (nCerulean), 525/50 nm (EGFP) 540/30 (EYFP) i 595/50 (tagRFP). Obrazy następnie analizowano w programie Fiji (Schindelin i in., 2012).

W celu oceny wzajemnej lokalizacji białek prowadzono analizę z wykorzystaniem współczynników Pearson'a i Mandersa.

Współczynnik Pearson'a – przyjmuje wartości od -1 do +1, gdzie 0 to brak korelacji a 1 – pełna korelacja

Współczynniki nakładania Manders'a - przyjmują wartości od 0 do 1, gdzie 0 to brak nakładania a 1 – pełna ko-lokalizacja; M1 definiuje stosunek ilości pikseli pierwszego kanału, dla których intensywność w miejscach sygnału z drugiego kanału jest powyżej 0 do sumy wszystkich pikseli pierwszego kanału; M2 definiuje to samo dla pikseli z drugiego analizowanego kanału (Manders i in., 1992).

Analizę prowadzono z wykorzystaniem funkcji Coloc2 w programie Fiji (Schindelin i in., 2012).

#### 4.6. Analizy FRET-FLIM

Analizy prowadzono z wykorzystaniem dwóch systemów zlokalizowanych w:

##### 1. IBMiB UAM Poznań

PicoHarp300-Dual Channel SPAD (PicoQuant) w połączeniu ze skaningowym mikroskopem konfokalnym Nikon A1Rsi. Pulsy światła generowane były przez laser Picosecond Pulsed Diode Laser LDH-D-C-485 (PicoQuant) o następujących parametrach: 100 ps, 40 MHz. Obiektyw wodny 60x/1.20.

##### 2. Centrum Mikrospektroskopowym, Wageningen University, Holandia (WUR)

Skaningowy mikroskop kofokalny Leica TCS SP5 X lub TCS SP8 połączony z wewnętrznym hybrydowym detektorem Hybrid (HyD) detector (Becker & Hickl).

Pulsy światła generowane były przez szerokopasmowy laser biały (WLL; 488 nm), o następujących parametrach: 100 ps, 40 MHz. Obiektów wodny 63×/1.20.

Rejestrowano obrazy o rozdzielczości 128x128 pikseli ze średnią wartością parametru „count rate” równą  $10^4/s$  przez ok. 60s. Uzyskanym danym w każdym pikselu uzyskanego obrazu była przypisywana krzywa spadku fluorescencji (*fluorescence decay curve*), do której następnie dopasowywano funkcję 2-składnikowego modelu i wyliczano czas trwania fluorescencji (*lifetime*) cząstek znajdujących się na terenie jądra komórkowego. Stosowano w tym celu oprogramowanie SymPhoTime 64 (PicoQuant) (UAM) lub SPCImage 3.10 (Becker & Hickl) (WUR).

Porównywano wyniki uzyskane dla komórek z białkami powstającymi w fuzji z donorem fluorescencji (GFP) i komórek transfekowanych dodatkowo plazmidami kodującymi białka z dołączonym akceptorem fluorescencji (tagRFP, tRFP). Analizy wykonywano na przynajmniej 10 protoplastach dla każdego badanego oddziaływania. Wyniki te pochodziły z przynajmniej dwóch powtórzeń biologicznych. W celu oceny istotności różnic między komórkami, w których dochodziło do ekspresji białka donorowego i komórkami z obecnością białka donorowego i akceptorowego stosowano Test t-Studenta oprogramowania Microsoft Excel (\* $p < 0,001$ ).

#### **4.7. Kombinacja technik mikroskopowych BiFC i FRET-FLIM**

W celu analizy spektrum emisji białka fluorescencyjnego, odtworzonego w transfekowanych protoplastach, wzbudzano go laserem o długości fali 440 nm (Picosecond Pulsed Diode Laser LDH-D-C-440 (PicoQuant)) i obserwowano emisję w zakresie 450-640 nm) co 7 nm. Długość trwania fluorescencji takiego białka donorowego mierzono w przypadku obecności i braku białka akceptorowego (tagRFP, tRFP) powstającego w fuzji z AtU1A lub ustrukturyzowanym fragmentem SE w ten sam sposób co pomiary FRET-FLIM opisane powyżej. Analizy te prowadzono w Centrum Mikrospektroskopowym, Wageningen University, Holandia (WUR).

#### **4.8. Dwubydrydowy system drożdżowy**

Procedurę prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawu Matchmaker Gold (Clontech), z modyfikacjami:

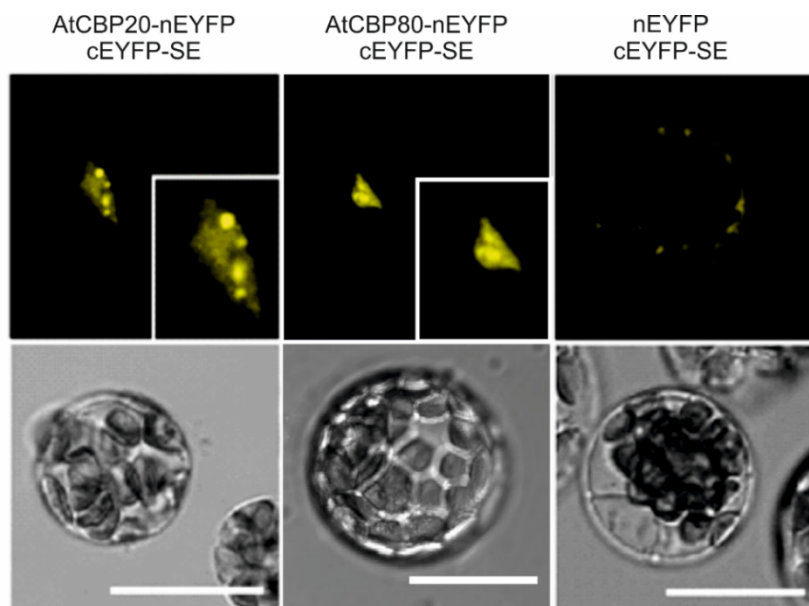
1. 50 ml płynnej pożywki YPDA zaszczipiano jedną kolonią drożdży *Saccharomyces cerevisiae* szczepu Matchmaker Gold i prowadzono hodowlę w 28 °C przez 16h z wytrząsaniem 180-250rpm.

2. Po całonocnej hodowli kulturę wstępną rozcieńczano w 100 ml świeżej płynnej pożywki YPDA do uzyskania  $OD_{600}=0,2$  i prowadzono hodowlę w  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem 180-250rpm do uzyskania  $OD_{600}=0,6$ .
3. Po osiągnięciu odpowiedniej gęstości hodowlę wirowano przez 5 min przy obrotach 700g w temperaturze pokojowej.
4. Osady komórek następnie zawieszono w 30ml wody dejonizowanej MiliQ, ponownie wirowano, po czym zawieszano w 1,5ml buforu TE/LiAC. Po zwirowaniu przez 15 s z szybkością 14000rpm osad ponownie zawieszono w 600 $\mu$ l buforu TE/LiAC. Objętość użytego buforu była uzależniona od wartości  $OD_{600}$ . Np. przy  $OD_{600}=0,6$  stosowano objętość 0,6ml. Tak przygotowane komórki kompetentne poddawano następnie procesowi transformacji jednocześnie dwoma plazmidami: jednym kodującym białko w fuzji z domeną aktywującą czynnika transkrypcyjnego Gal4 i drugim kodującym białko w fuzji z domeną wiążącą DNA czynnika transkrypcyjnego Gal4.
5. Do plazmidów (700ng każdy) przygotowanych w schłodzonych 1,5 ml probówkach dodawano na lodzie 5  $\mu$ l zdenaturowanego uprzednio w  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 5 min Carrier DNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l), 50 $\mu$ l kompetentnych komórek, 500 $\mu$ l buforu PEG/LiAC, dokładnie mieszano i inkubowano w  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem 1000rpm przez 30 min.
6. Do próbek następnie dodawano 20 $\mu$ l DMSO i inkubowano w  $42^{\circ}\text{C}$  przez 20 min co 5 min mieszając próby.
7. Próby następnie wirowano przez 15 s z prędkością 14000rpm, odrzucano supernatant i osad zawieszono w 400 $\mu$ l buforu 1xstężonego TE.
8. 250 $\mu$ l zawiesiny transformowanych komórek drożdżowych wysiewano następnie na szalki ze stałą pożywką DDO (SD-Leu-Trp) i hodowano przez 4 dni w  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
9. Uzyskane kolonie drożdżowe przeszczepiano na szalki z pożywką stałą DDO, QDO (SD-Leu-Trp-Ade-His), QDO/X/A (SD-Leu-Trp-Ade-His + AurA + X- $\alpha$ Gal), hodowano przez 3 dni w  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  a następnie rejestrowano wynik aparatem fotograficznym.

### 5.1. Charakterystyka oddziaływania SERRATE z roślinnym kompleksem wiążącym czapeczkę (AtCBC)

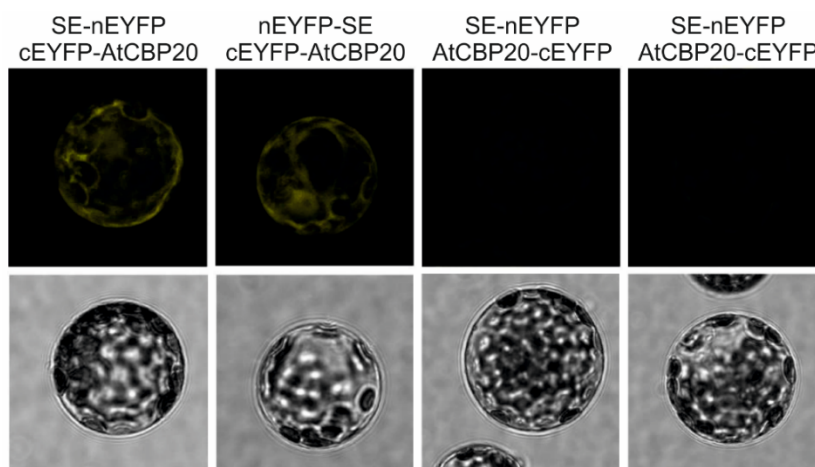
Wstępne wyniki uzyskane w Zakładzie Ekspresji Genów wskazywały na istnienie bezpośredniego oddziaływania między SERRATE (SE) i jedną z podjednostek kompleksu wiążącego czapeczkę *Arabidopsis thaliana* (AtCBC, ang. *cap binding complex*), tj. AtCBP80. Nie było jednak wiadomo, czy AtCBP80 ma zdolność do wiązania się z SE i AtCBP20 (drugą podjednostką kompleksu wiążącego się z m7G) jednocześnie, czy może interakcje te zachodzą niezależnie od siebie i AtCBP80 w danym momencie wiąże się tylko do jednego ze swoich partnerów - AtCBP20 lub SE.

W celu przeprowadzenia pełniejszej charakterystyki oddziaływań AtCBC – SE w pierwszej kolejności wykorzystano technikę BiFC (ang. *Bimolecular Fluorescence Complementation*). Protoplasty izolowano z liści 3-tygodniowych roślin *A. thaliana* i transfekowano plazmidami kodującymi SE w fuzji z karboksylową częścią EYFP, tj. cEYFP (ang. *carboxy-terminal half of Enhanced Yellow Fluorescence Protein*), oraz AtCBP20 lub AtCBP80 w fuzji z komplementarną połówką EYFP, tj. nEYFP (ang. *amino-terminal half of EYFP*), i obserwowano, czy dochodzi do odtworzenia struktury EYFP dzięki oddziaływaniom między analizowanymi białkami. Fluorescencję EYFP zarejestrowano zarówno w przypadku obecności w protoplastach białek cEYFP-SE i AtCBP20-nEYFP jak również białek cEYFP-SE i AtCBP80-nEYFP (Ryc. 9). Sygnały te występowały w skupiskach zlokalizowanych na terenie jądra komórkowego. Na specyficzność tych struktur wskazują wyniki eksperymentów, w których protoplasty transfekowano plazmidami kodującymi cEYFP-SE i niezwiązaną z żadnym innym białkiem komplementarną połówką białka fluorescencyjnego (nEYFP). W komórkach tych zarejestrowano tylko słaby sygnał na terenie cytoplazmy (Ryc. 9). Wyniki opisanych eksperymentów wykazały więc zdolność SE do specyficznego oddziaływania z obydwiema podjednostkami AtCBC w żywej komórce roślinnej. W trakcie wykonywania analiz skupiono się szczególnie na słabiej scharakteryzowanym oddziaływaniu SE-AtCBP20, dzięki czemu odkryto pewne wymagania strukturalne tego wiązania. Po transfekcji protoplastów każdą możliwą kombinacją konstruktów kodujących SE w fuzji z nEYFP oraz AtCBP20-cEYFP zaobserwowano tylko słaby sygnał cytoplazmatyczny lub w ogóle nie doszło do odtworzenia struktury EYFP (Ryc. 10).



**Ryc. 9 Analiza oddziaływań między *SERRATE* (*SE*) i podjednostkami *AtCBC* (*AtCBP20*, *AtCBP80*) w protoplastach *Arabidopsis thaliana* przy zastosowaniu techniki *BiFC* (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)**

*nEYFP*, *cEYFP* – połówka aminowa i karboksylowa białka fluorescencyjnego *EYFP*; dolny panel przedstawia obraz światła przechodzącego protoplastów, w których obserwowano fluorescencję (górny panel); skala równa 20  $\mu\text{m}$ .



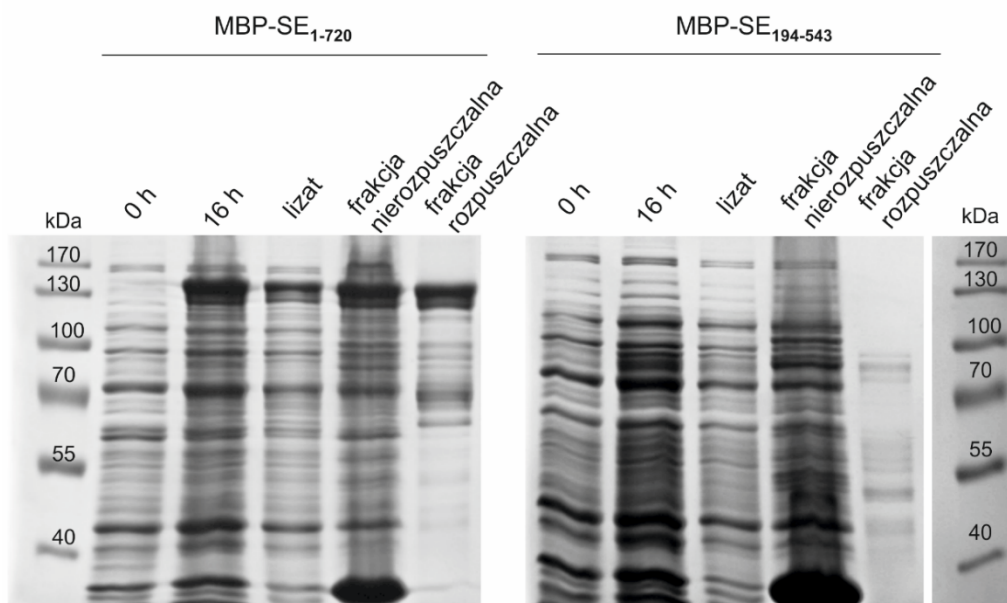
**Ryc. 10 Szczegółowa analiza oddziaływań między *SERRATE* (*SE*) i *AtCBP20* (podjednostką *AtCBC*) w protoplastach *Arabidopsis thaliana* przy zastosowaniu techniki *BiFC* (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)**

*nEYFP*, *cEYFP* – połówka aminowa i karboksylowa białka fluorescencyjnego *EYFP*; dolny panel przedstawia obraz światła przechodzącego protoplastów, w których obserwowano fluorescencję (górny panel).

Wykazano w ten sposób, że zamiana fragmentów *EYFP* w parze *AtCBP20-SE* wywołuje brak zdolności do oddziaływania tych białek ze sobą.

W następnym etapie badań, w celu potwierdzenia wyników uzyskanych techniką BiFC oraz dodatkowo, aby zidentyfikować fragment SE zaangażowany w oddziaływanie z AtCBC, zastosowano technikę *pull down*. Eksperymenty te poprzedzone były przygotowaniem „białka - przynęty”, za które posłużyło SE w dwóch wariantach, tj. białko pełnej długości (1-720 aminokwasów (aa); 81 kDa) i ustrukturyzowany rdzeń (194-543 aa; 40 kDa) (Machida i in., 2011). Obydwie wersje białka zaprojektowano by powstawały w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP, ang. *maltose binding protein*, 42 kDa), służącym za etykietę w trakcie eksperymentów typu *pull down*. Przygotowanymi konstruktami transformowano komórki *Escherichia coli* i w pierwszej kolejności prowadzono nadekspresję w dwóch zestawach warunków testowych - nadekspresja w 20 °C przez 16 godzin i w 37 °C przez 1-4 godziny.

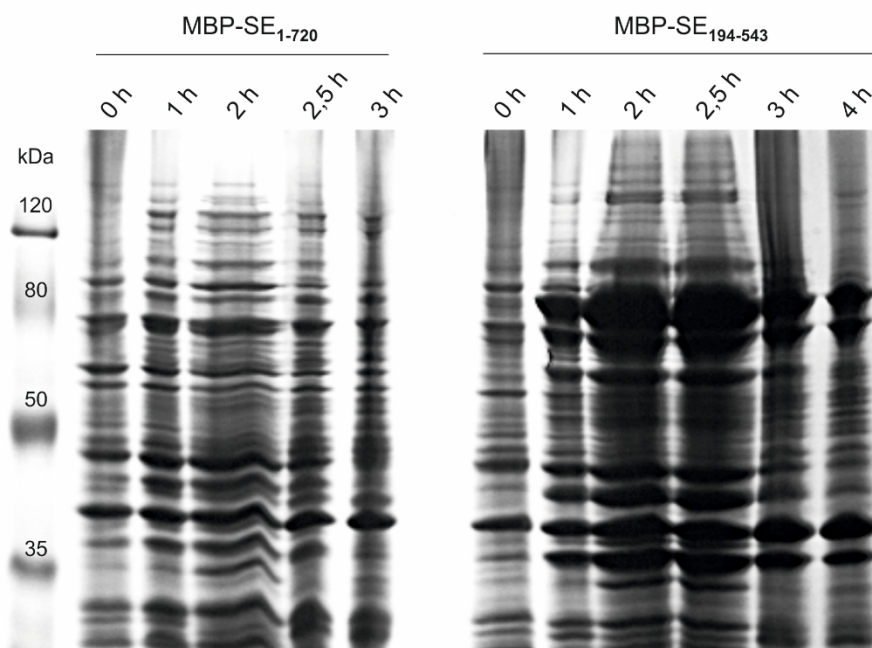
Białko rekombinowane MBP-SE<sub>1-720</sub> (123 kDa) otrzymano po indukcji nadekspresji 0,4 mM IPTG i całonocnej hodowli bakterii w 20 °C (Ryc. 11).



**Ryc. 11 Nadekspresja wariantów białka *SERRATE* (SE) w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w *Escherichia coli*, prowadzona w 20°C przez 16 godzin**

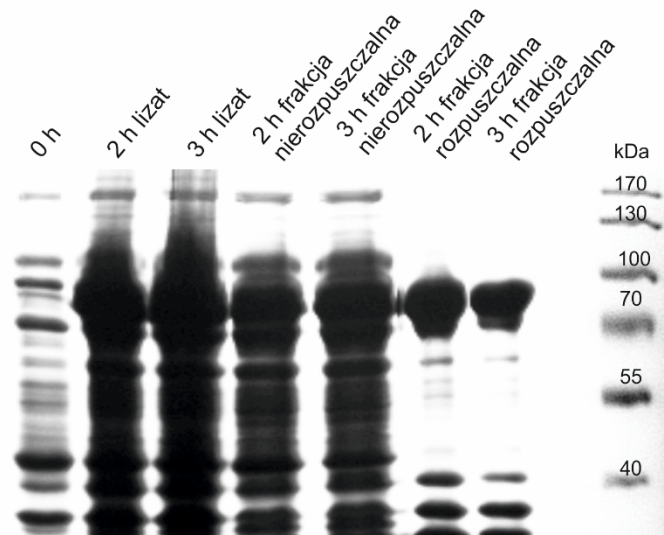
SE<sub>1-720</sub> – SE pełnej długości, SE<sub>194-543</sub> – ustrukturyzowany rdzeń SE; liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym; na żel poliakrylamidowy nakładano próbę pobraną zaraz przed indukcją nadekspresji (0 h), po 16 godzinach nadekspresji (16 h), lizat bakteryjny uzyskany w wyniku sonikacji komórek *E. coli* (lizat), jak również frakcję rozpuszczalną, czyli supernatant pobrany z nad pozostałości komórek (frakcja nierozpuszczalna) po odwirowaniu lizatu; liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych prążków markera.

Optymalne warunki dla produkcji ustrukturyzowanego rdzenia SE w fuzji z MBP (82 kDa) okazały się natomiast inne. Nie uzyskano tej wersji białka po całonocnej nadekspresji prowadzonej w 20 °C (Ryc. 11), ale już po jednej godzinie eksperymentu prowadzonego w 37 °C (Ryc. 12). Wyższa temperatura nie była jednakże optymalna dla produkcji SE pełnej długości, bez względu na czas trwania hodowli (1-4 godziny) (Ryc. 12). W kolejnych eksperymentach stosowano więc dwa rodzaje warunków do produkcji dwóch wspomnianych wariantów SE – nadekspresja w 20 °C przez 16 godzin dla białka pełnej długości i w 37 °C przez dwie godziny dla ustrukturyzowanego fragmentu SE. W przypadku obydwóch wersji SE, po zastosowaniu optymalnych dla nich warunków, zaobserwowano obecność białka zarówno we frakcji rozpuszczalnej, jak i nierozpuszczalnej (Ryc. 11 i 13), jednakże jego ilość we frakcji rozpuszczalnej oceniono na wystarczającą dla celów analiz typu *pull down*.



**Ryc. 12** Nadekspresja dwóch wariantów białka *SERRATE* (SE) w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w *Escherichia coli*, prowadzona w 37 °C

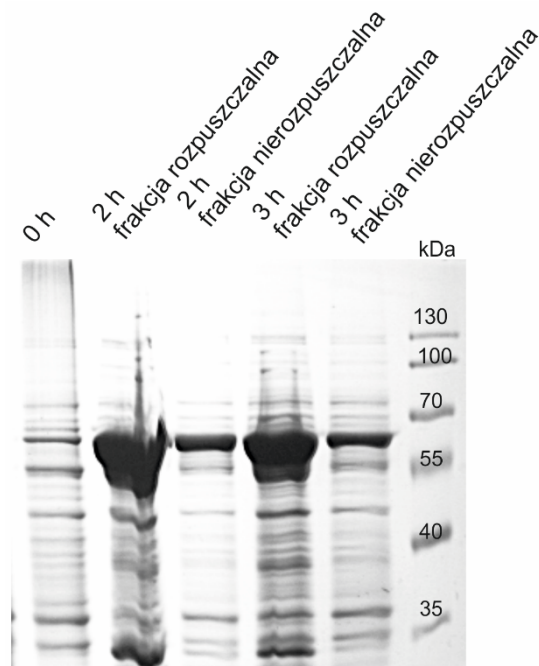
*SE*<sub>1-720</sub> – SE pełnej długości, *SE*<sub>194-543</sub> – ustrukturyzowany rdzeń SE; liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym; na żel poliakrylamidowy nakładano próbę pobraną zaraz przed indukcją nadekspresji (0 h) i po 1-4 godzinach (1-4 h); liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych prążków markera.



**Ryc. 13** Nadekspresja ustrukturyzowanego fragmentu białka SE, tj.  $SE_{194-543}$ , w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w *Escherichia coli*, prowadzona w 37°C

$SE_{194-543}$  – ustrukturyzowany rdzeń SE; liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym; na żel poliakrylamidowy nakładano próbę pobraną zaraz przed indukcją nadekspresji (0 h), lizat bakteryjny uzyskany w wyniku sonikacji komórek *E. coli* (lizat) oraz frakcję rozpuszczalną, czyli supernatant pobrany z nad pozostałości komórek (frakcja nierozpuszczalna) po odwirowaniu lizatu powstałego wskutek sonikacji komórek *E. coli*; nadekspresję prowadzono przez dwie i trzy godziny (2h, 3h); liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych prążków markera.

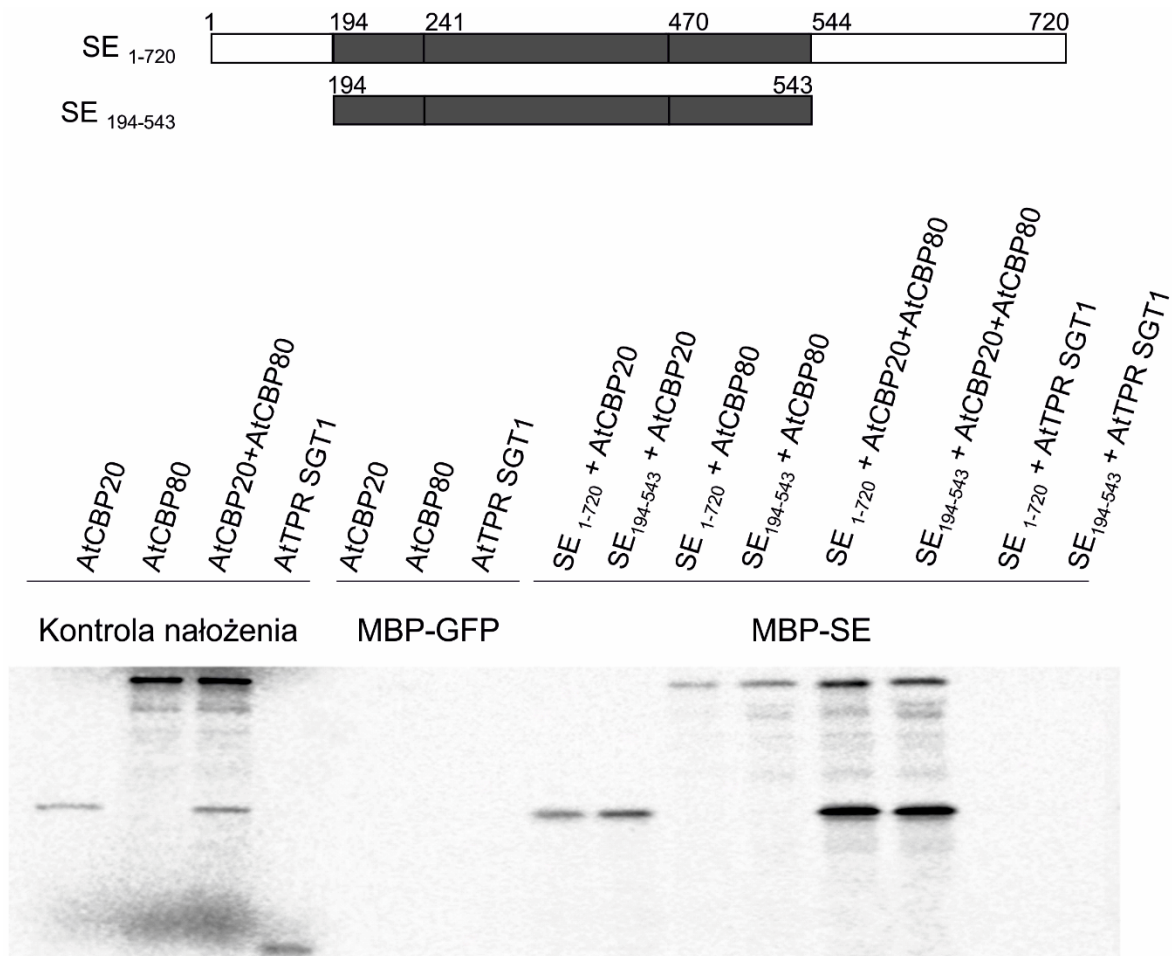
W celu przeprowadzenia kontroli niespecyficznego wiązania się białek do MBP-SE, przygotowano także białko fuzyjne MBP-GFP (ang. *green fluorescent protein*). Nadekspresję białka o masie odpowiadającej MBP-GFP (65 kDa) uzyskano po traktowaniu bakterii 0,4 mM IPTG i późniejszej hodowli w 37 °C przez dwie lub trzy godziny (Ryc. 14). Bez względu na czas trwania hodowli, powstałe białko rekombinowane występowało we frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej. Pierwszy z wymienionych preparatów, uzyskany po dwóch godzinach nadekspresji, wykorzystano następnie w trakcie eksperymentów typu *pull down*.



**Ryc. 14** Nadekspresja białka GFP w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w *Escherichia coli*

Na żel poliakrylamidowy nakładano próbę pobraną zaraz przed indukcją nadekspresji (0 h) oraz frakcję rozpuszczalną, czyli supernatant pobrany z nad pozostałości komórek (frakcja nierozpuszczalna) po odwirowaniu lizatu powstałego wskutek sonikacji komórek *E. coli*; nadekspresję prowadzono przez dwie i trzy godziny (2h, 3h); liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych prążków markera.

W celu przeprowadzenia eksperymentów typu *pull down* podjednostki AtCBC otrzymano na drodze translacji *in vitro* prowadzonej z dodatkiem radioaktywnie znakowanej metioniny [ $^{35}\text{S}$ ]. Próby po translacji inkubowano następnie przez dwie godziny ze związanym na złożu amylozowym SE. W tym samym czasie przeprowadzono również kontrolę niespecyficznego wiązania się białek AtCBC do ziaren amylozowych i do etykiety MBP w postaci inkubacji preparatów zawierających te białka ze związanym do złoża MBP-GFP. Uzyskane kompleksy po intensywnym płukaniu i elucji 10 mM maltozą rozdzielano w żelu poliakrylamidowym, a następnie rejestrowano sygnały, odpowiadające AtCBP20 i AtCBP80. Obecność podjednostek AtCBC w kompleksie z SE zaobserwowano zarówno w przypadku pełnej długości białka, jak również po związaniu do złoża MBP-SE<sub>194-543</sub>. Wykazano więc w ten sposób, że w warunkach *in vitro* ustrukturyzowany rdzeń SE jest wystarczający dla oddziaływania z AtCBP20 i AtCBP80 (Ryc. 15).



**Ryc. 15 Analiza oddziaływań między SERRATE (SE) i podjednostkami AtCBC (AtCBP20, AtCBP80) przy zastosowaniu techniki pull down**

Górny panel przedstawia schemat wariantów SE wykorzystywanych w trakcie analiz; SE<sub>1-720</sub> – SE pełnej długości, SE<sub>194-543</sub> – ustrukturyzowany rdzeń SE; liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym; Dolny panel przedstawia wynik analizy typu pull down; MBP-GFP i MBP-SE to białka rekombinowane uzyskane poprzez nadekspresję w *E. coli*; MBP – białko wiążące maltozę (ang. maltose binding protein); kontrola nałożenia wynosi 1/20 próby otrzymanej w wyniku translacji *in vitro* i wykorzystanej w eksperymencie.

W trakcie eksperymentów zastosowano również domenę TPR AtSGT1 (ang. Suppressor of the G2 allele of SKP1), uzyskaną na drodze translacji *in vitro*, jako kontrolę niespecyficznego wiązania się białek do MBP-SE. Brak sygnału, odpowiadającego TPR, po inkubacji z MBP-SE, jak również nieobecność AtCBC w próbach, w których do złoża wiązano MBP-GFP, potwierdziły specyficzną wykazaną bezpośredniego oddziaływania między SE i podjednostkami AtCBC. Ponadto, porównując siłę sygnału podjednostek AtCBC w próbie odpowiadającej kontroli nałożenia i po inkubacji z SE,

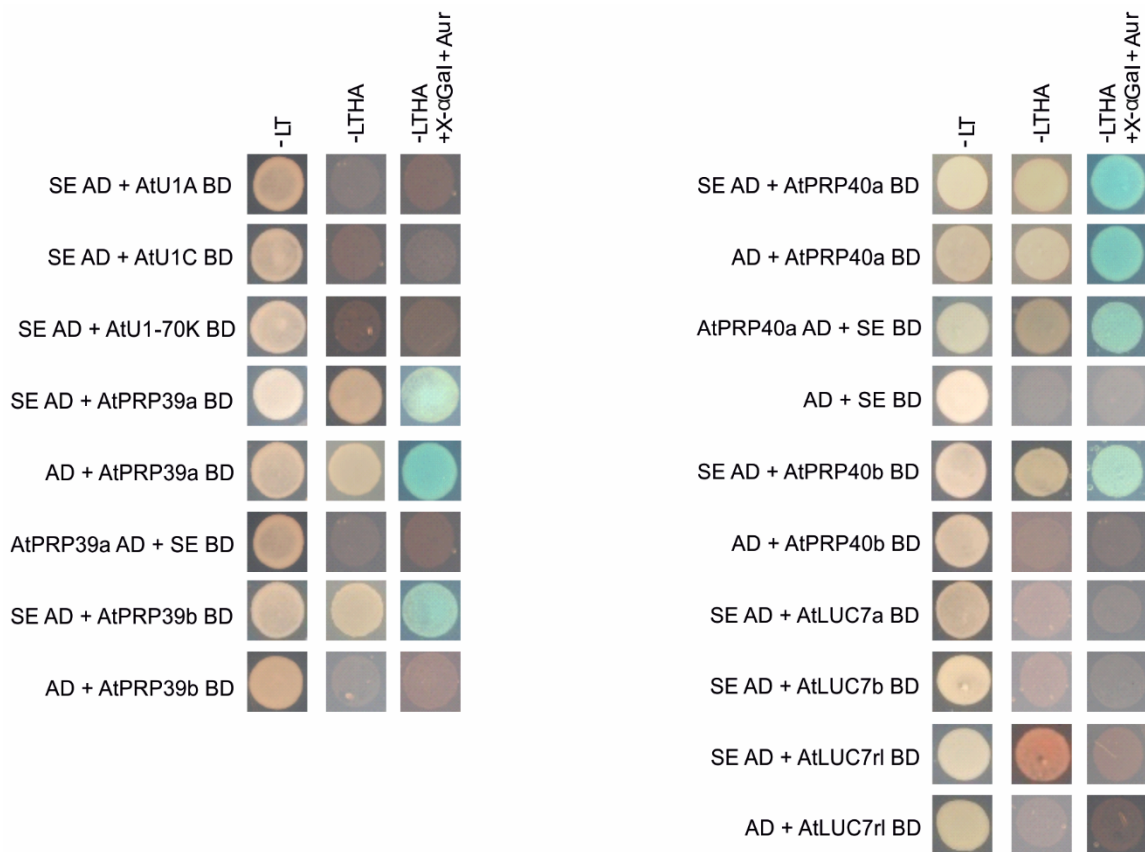
zaobserwowano wydajniejsze wiązanie AtCBP20, w porównaniu z AtCBP80. W kontroli nałożenia, stanowiącej 1/20 objętości preparatów uzyskanych w wyniku translacji *in vitro*, sygnał AtCBP80 był mocniejszy niż AtCBP20. Po inkubacji ze związanymi na złożu wariantami SE stosunek intensywności prążków przesunął się natomiast na korzyść AtCBP20, sugerując większą ilość cząsteczek tego białka w kompleksie z SE. Co więcej, po inkubacji SE ze zmieszanyymi obydwoma podjednostkami AtCBC w stosunku objętościowym 1:1, zaobserwowano mocniejsze sygnały AtCBP20 i AtCBP80 w porównaniu z indywidualnymi oddziaływaniami SE/AtCBP20 i SE/AtCBP80. Wynik taki uzyskano pomimo dodawania takiej samej objętości preparatów podjednostek AtCBC do badania oddziaływań indywidualnych i w kompleksie. Podobnie do wyników oddziaływań indywidualnych, w próbie z trzema białkami sygnał AtCBP20 był mocniejszy w porównaniu z intensywnością prążka odpowiadającego AtCBP80. Wyniki te wskazują na możliwość tworzenia potrójnego kompleksu zbudowanego z trzech białek jednocześnie oraz stabilizację oddziaływań między tworzącymi go komponentami.

## 5.2. Identyfikacja białka/białek snRNP U1, które oddziałują z SERRATE

Zgodnie z postawioną w niniejszej pracy hipotezą białko SE jest elementem łączącym białka zaangażowane w biogenezę miRNA, w tym AtCBC, z kompleksem snRNP U1, oddziałującym z miejscem splicingowym 5'. W celu identyfikacji partnera (partnerów) białkowego SE wśród elementów snRNP U1 wykorzystano dwuhybrydowy system drożdżowy (Matchmaker Gold, Clontech), który ze względu na obecność aż czterech genów reporterowych, pozwala zminimalizować prawdopodobieństwo uzyskania fałszywie pozytywnego wyniku. W sytuacji, gdy dwa analizowane białka oddziałują ze sobą, komórki drożdżowe są zdolne do wzrostu na pożywce (1) bez histydyny, (2) bez adeniny, (3) z dodatkiem toksycznej Aureobazydyny A, jak również (4) przekształcają X- $\alpha$ -Gal do produktu, dającego koloniom drożdżowym niebieskie zabarwienie. W trakcie eksperymentów wykorzystano sekwencje kodujące SE pełnej długości oraz wszystkie dziesięć specyficznych białek kompleksu U1 u *Arabidopsis thaliana*, tj. AtU1A, AtU1C, AtU1-70K, AtPRP39a i b, AtPRP40a i b, AtLUC7a i b oraz AtLUC7rl (Wang i Brendel, 2004).

W pierwszej kolejności eksperymenty prowadzono wykorzystując konstrukty kodujące SE w fuzji z domeną aktywującą czynnika transkrypcyjnego Gal4 (AD, ang. *activation domain*) oraz białka snRNP U1 w fuzji z domeną wiążącą Gal4 (BD, ang. *binding domain*). W trakcie tych analiz nie zaobserwowano wzrostu drożdży w przypadku badania wiązania SE z podstawowymi elementami snRNP U1, tj. AtU1A, AtU1C i AtU1-70K (Ryc. 16). Wykazano natomiast specyficzne oddziaływanie SE z trzema białkami pomocniczymi snRNP U1, tj. AtPRP39b, AtPRP40b oraz AtLUC7rl. W przypadku ostatniego z wymienionych białek nie zaobserwowano wzrostu komórek na pożywce zawierającej wszystkie markery selekcyjne. Odnotowano aktywację tylko dwóch z czterech genów reporterowych, tj. genów pozwalających komórkom na wzrost na pożywce bez histydyny i adeniny.

Ze względu na niespecyficzną auto-aktywację ekspresji genów reporterowych przez AtPRP39a i AtPRP40a, powstające w fuzji z domeną wiążącą Gal4 (BD), konieczne było przeprowadzenie eksperymentów w odwrotnej konformacji – SE w fuzji z domeną wiążącą Gal4 (BD), a AtPRP39a i AtPRP40a z domeną aktywującą (AD). W ten sposób wykazano dodatkowe specyficzne oddziaływanie między SE i AtPRP40a. Po zmianie konformacji nie zaobserwowano natomiast wzrostu drożdży w przypadku analizy wiązania SE z AtPRP39a.

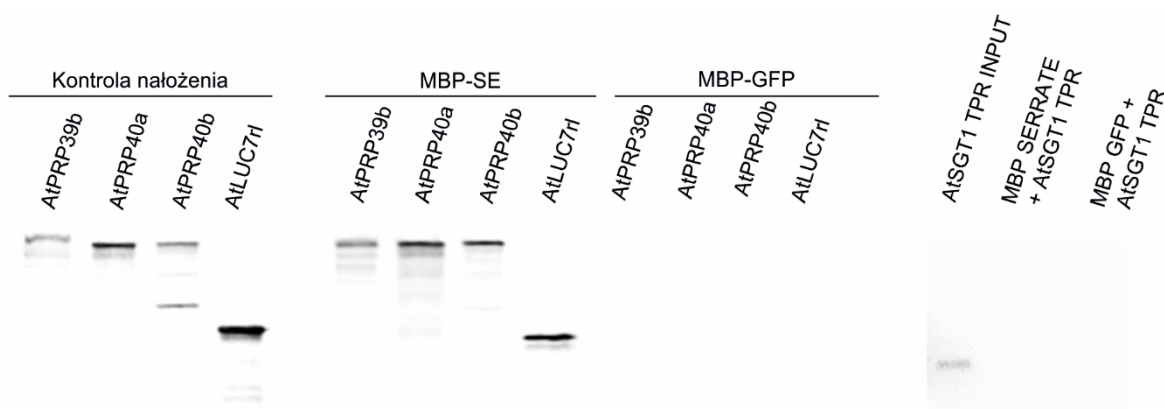


**Ryc. 16 Identyfikacja białek kompleksu snRNP U1 oddziałujących z *SERRATE* (SE) przy pomocy dwyhydrydowego systemu drożdżowego**

AD – domena aktywująca czynnika transkrypcyjnego Gal4; BD – domena wiążąca DNA czynnika transkrypcyjnego Gal4; wzrost obserwowano na pożywce pozbawionej (-): leucyny (L), tryptofanu (T), histydyny (H) i adeniny (A), z dodatkiem (+): X-α-Gal, Aureobazydyny A (Aur).

Bezpośrednie oddziaływania między SE i czterema białkami snRNP U1 potwierdzono w kolejnym etapie techniką *pull down*, którą wykorzystano w sposób podobny do analizy oddziaływań SE/AtCBC. W przeciwieństwie do wspomnianych eksperymentów, na tym etapie badań analizowano jedynie oddziaływania pełnej długości SE (MBP-SE). Rekombinowane białko MBP-SE i MBP-GFP otrzymano w *E. coli*, a potencjalnych partnerów SE, tj. AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl, przy zastosowaniu translacji *in vitro* z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanej metioniny [<sup>35</sup>S]. Po inkubacji prób radioaktywnych ze związanym na złożu MBP-SE zarejestrowano silny sygnał w przypadku wszystkich analizowanych białek snRNP U1 (Ryc. 17). Na specyficzność wykazanych w ten sposób bezpośrednich oddziaływań wskazał brak sygnału komponentów snRNP U1 w analogicznie przeprowadzonym eksperymencie

z wykorzystaniem MBP-GFP oraz domeny TPR białka AtSGT1, zastosowanej, jako kontrola niespecyficznego wiązania się białek do MBP i/lub SE.

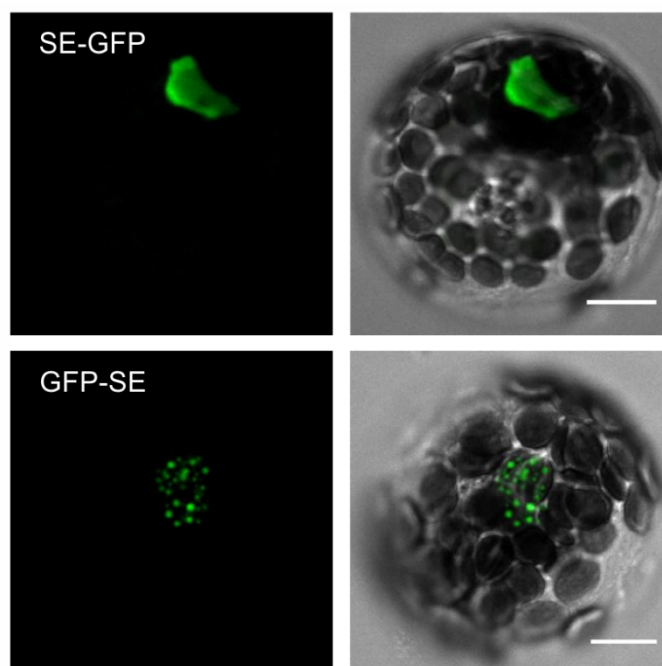


**Ryc. 17 Analiza oddziaływania między *SERRATE* (SE) i wybranymi białkami kompleksu *snRNP U1* przy zastosowaniu techniki pull down**

*MBP-GFP* i *MBP-SE* to białka rekombinowane uzyskane poprzez nadekspresję w *E. coli*; *MBP* – białko wiążące maltozę (ang. maltose binding protein); kontrola nałożenia wynosi 1/20 próby otrzymanej w wyniku translacji *in vitro* i wykorzystanej w eksperymencie.

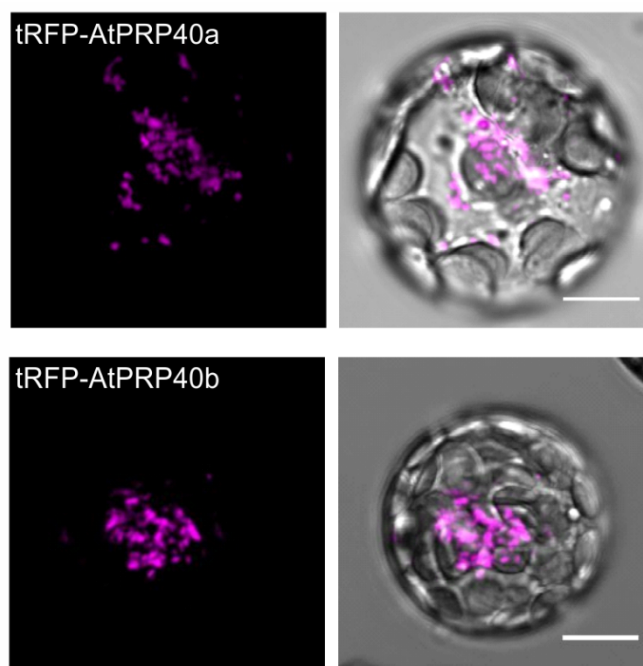
W kolejnym etapie badań sprawdzono czy wszystkie cztery zidentyfikowane oddziaływania zachodzą również w żywych komórkach roślinnych. Właściwy eksperyment poprzedziła charakterystyka lokalizacji komórkowej SE, AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7l w transfekowanych protoplastach *A. thaliana*.

W pierwszej kolejności ustalono optymalne miejsce przyłączenia białek fluorescencyjnych. W przypadku fuzji GFP z SE zaobserwowano sygnał jądrowy, bez względu na to, czy GFP znajdowało się na końcu aminowym lub karboksylowym SE (Ryc. 18). Fuzja GFP z karboksylowym końcem SE spowodowała jednak, że białko to charakteryzowało się sygnałem homogennym, pozbawionym specyficznych dla SE ziarnistości (Fang i Spector, 2007). Z tego powodu we wszystkich kolejnych eksperymentach wykorzystywano konstrukty kodujące SE z GFP dołączonym na jego końcu aminowym. W celu lokalizacji badanych białek snRNP U1 stosowano natomiast przeciwną konformację, tj. białko tagRFP (tRFP) na ich końcu karboksylowym. Na takie podejście zdecydowano się szczególnie ze względu na niespecyficzny agregatowy sygnał cytoplazmatyczny, który zaobserwowano w przypadku transfekcji protoplastów konstrukcjami kodującymi tRFP-AtPRP40a i tRFP-AtPRP40b (Ryc. 19).



**Ryc. 18** Analiza lokalizacji *SERRATE* (*SE*), powstającego w fuzji z białkiem fluorescencyjnym *GFP*, przyłączonym na karboksylowym lub aminowym końcu *SE* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

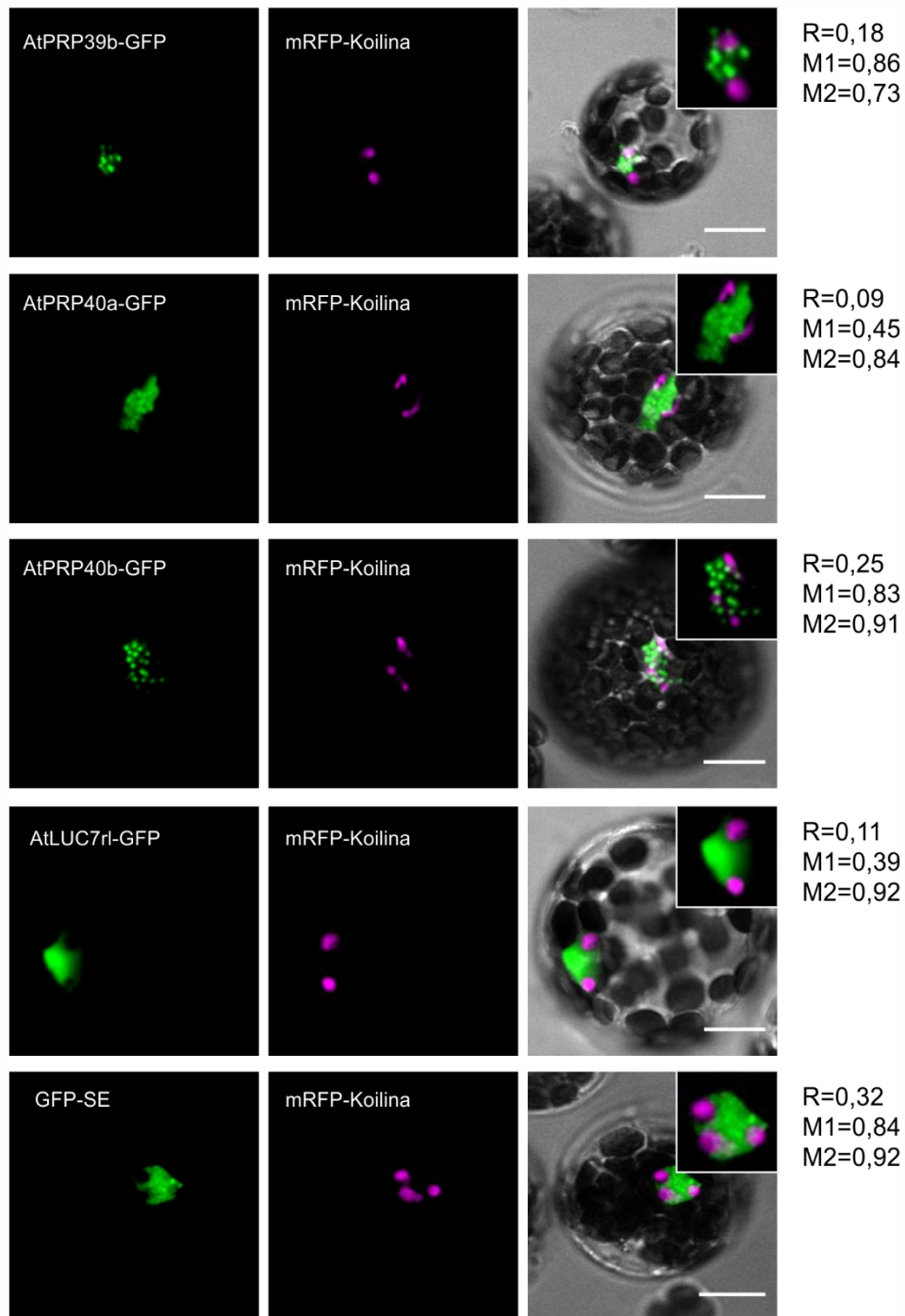


**Ryc. 19** Analiza lokalizacji *AtPRP40a* i *AtPRP40b*, powstających w fuzji z białkiem fluorescencyjnym *tagRFP* (*tRFP*), przyłączonym do ich aminowych końców w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

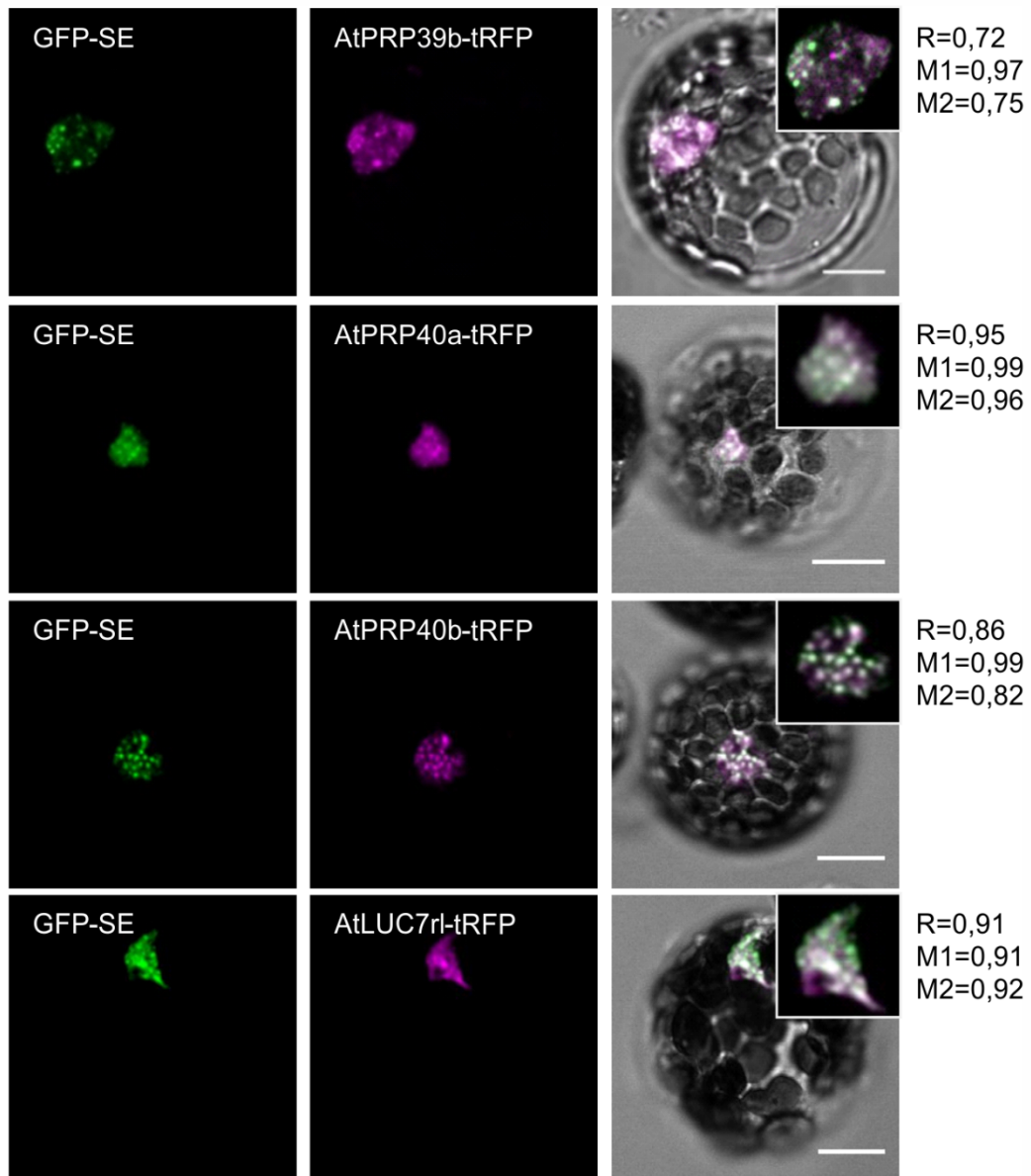
W celu pełniejszej charakterystyki wytypowanych partnerów SE, analizowano również ich lokalizację komórkową w protoplastach wyizolowanych z liści linii *A. thaliana*, w której dochodzi do nadekspresji markera ciał Cajala, tj. koiliny. Białko to powstaje w tych roślinach w fuzji z mRFP (ang. *monomeric red fluorescent protein*) (Collier i in., 2005), stąd w konstrukcjach kodujących komponenty snRNP U1 oraz SE obecna była sekwencja kodująca GFP. Zarówno w przypadku białek kompleksu snRNP U1, jak i SE, nie zaobserwowano ich występowania w strukturach bogatych w koilinę (Ryc. 20). Wskazują na to niskie wartości współczynnika korelacji Pearson'a (R), które nie przekroczyły liczby 0,33. Współczynniki nakładania Manders'a osiągnęły wartości w zakresie 0,45-0,92, jednakże biorąc pod uwagę uzyskane obrazy i pierwszy wymieniony współczynnik są one wynikiem przypadkowego nałożenia się sygnałów.

W kolejnym etapie zbadano wzajemną lokalizację SE i partnerów snRNP U1 w protoplastach *A. thaliana*. SE powstawało w fuzji z GFP, natomiast do białek kompleksu U1 dołączone było tRFP (Ryc. 21). Analizy te wykazały, że wszystkie badane białka charakteryzują się sygnałem jądrowym, jak również, że elementy snRNP U1 znajdują się dokładnie w tych samych skupiskach jądrowych, w których występuje SE. Wskazuje na to wysoka wartość współczynnika Pearson'a, która plasowała się w zakresie 0,72-0,97 oraz współczynników Manders'a (ponad 0,75).



**Ryc. 20** Analiza wzajemnej lokalizacji wybranych białek wchodzących w skład snRNP U1 i SE z markerem ciała Cajala – Koiliną w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

R, współczynnik Pearson'a; M1 i M2, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

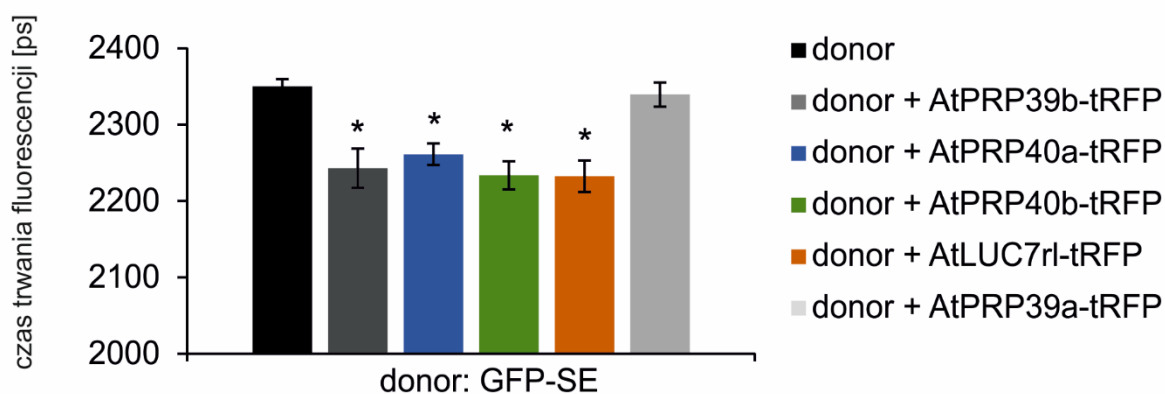


**Ryc. 21** Analiza wzajemnej lokalizacji *SERRATE* (*SE*) i wybranych białek wchodzących w skład *snRNP U1* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

W celu sprawdzenia, czy ko-lokalizacja badanych białek w żywej komórce roślinnej jest wynikiem ich oddziaływań zastosowano kombinację technik mikroskopowych FRET-FLIM (ang. *Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging*). Wspomniane podejście badawcze pozwala na badanie bezpośrednich interakcji białkowych *in vivo* i polega na pomiarze czasu trwania fluorescencji donora (ang. *donor fluorescence lifetime*), który obniża się, gdy w odległości nieprzekraczającej 5 nm znajduje się białko akceptorowe (Bucherl i in., 2010). Dochodzi wtedy do nieradiacyjnego przekazywania energii między cząsteczką donorową (np. GFP) i akceptorową (np. tRFP), pasujących do siebie pod względem spektrum emisji i absorpcji.

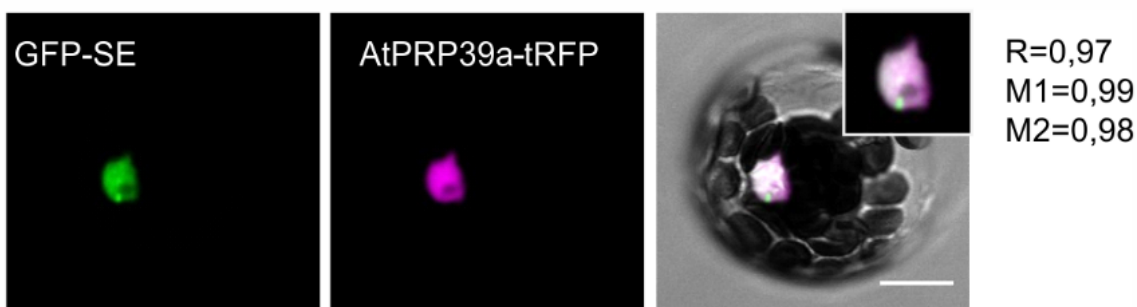
Obecność któregośkolwiek z wytypowanych uprzednio białek snRNP U1, powstających w fuzji tRFP w protoplastach *A. thaliana*, powodowała statystycznie istotne ( $p < 0,001$ ) obniżenie czasu trwania fluorescencji donora, którym było SE w fuzji z GFP (Ryc. 22). Wyniki te wskazują na bezpośredni charakter oddziaływań między SE i AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl w żywej komórce roślinnej.



**Ryc. 22 Analiza oddziaływania między SERRATE (SE) i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

Donor - GFP w fuzji z SE (GFP-SE); Akceptor - tRFP, tagRFP (tRFP) w fuzji z białkami AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b, AtLUC7rl lub AtPRP39a; słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM, standard error of the mean;  $n > 10$ ); gwiazdki wskazują istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora ( $*p < 0,001$ ).

W celu sprawdzenia specyficzności wykazanych zmian, protoplasty *A. thaliana* transfekowano jednocześnie plazmidami kodującymi GFP-SE i AtPRP39a-tRFP, gdyż białka te nie wykazały oddziaływania w eksperymentach dwuhybrydowego systemu drożdżowego (Ryc. 16). Pomimo lokalizacji obydwóch białek w jądrze komórkowym (Ryc. 23), nie zaobserwowano istotnej zmiany czasu trwania fluorescencji GFP-SE w obecności AtPRP39a-tRFP, co zgodnie z wynikami poprzednich eksperymentów wskazuje na brak bezpośrednich oddziaływań między tymi elementami (Ryc. 22).

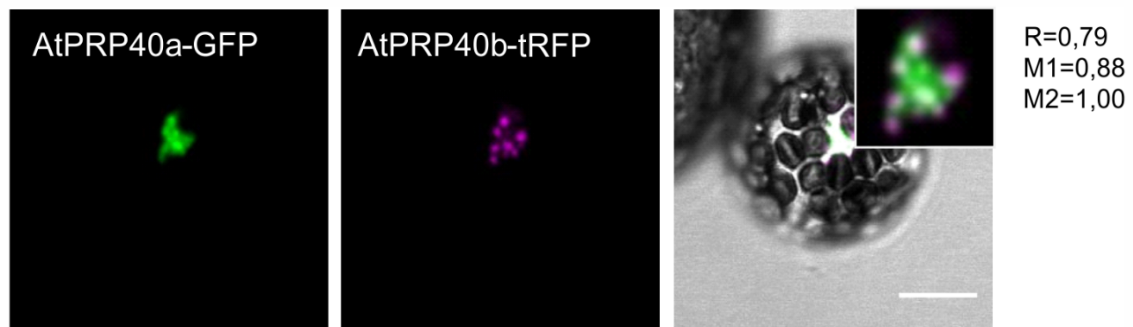


**Ryc. 23 Analiza wzajemnej lokalizacji *SERRATE* (SE) i *AtPRP39a* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

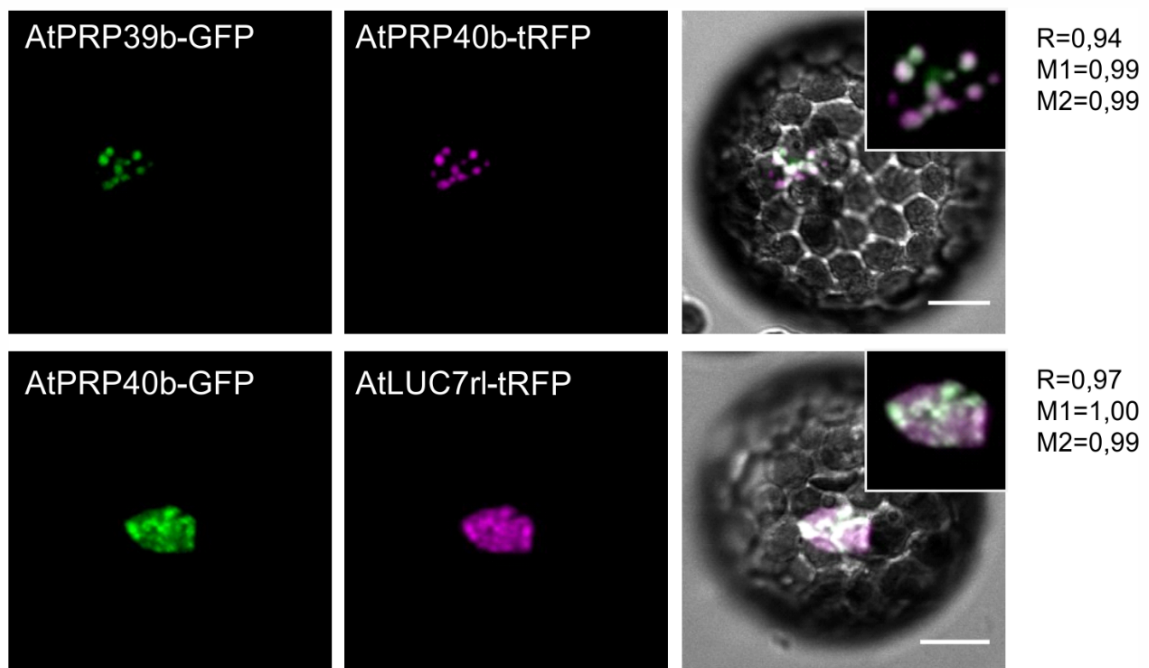
W kolejnym etapie sprawdzono wzajemną lokalizację partnerów SE wśród snRNP U1 w transfekowanych protoplastach *A. thaliana*. W pierwszej kolejności analizowano miejsce występowania AtPRP40a-GFP i AtPRP40b-tRFP. Zaobserwowano nakładanie się obydwóch sygnałów w jądrze komórkowych, jednakże współczynniki Pearson'a i Manders'a nie osiągnęły wartości 1, wskazując na niepełną ko-lokalizację badanych białek (Ryc. 24). Wartość M1 na poziomie 0,88 wskazała na obecność AtPRP40a w dodatkowych strukturach, poza miejscem lokalizacji AtPRP40b. Następnie sprawdzono, czy w miejscu występowania AtPRP40b znajduje się również AtPRP39b i AtLUC7rl. Po transfekcji komórek konstruktami kodującymi AtPRP40b-tRFP i AtPRP39b-GFP odnotowano wysoki stopień nakładania się sygnałów odpowiadających tym białkom (Ryc. 25). Do takiej samej sytuacji doszło w przypadku obecności w protoplastach AtPRP40b-GFP i AtLUC7rl-tRFP (Ryc. 25). Wyniki tych analiz wskazały więc na obecność

wszystkich partnerów SE wśród białek snRNP U1 w tych samych strukturach komórkowych.



**Ryc. 24** Analiza wzajemnej lokalizacji *AtPRP40a* i *AtPRP40b* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu\text{m}$ .



**Ryc. 25** Analiza wzajemnej lokalizacji *AtPRP39b* oraz *AtLUC7rl* z *AtPRP40b* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Charakterystyka oddziaływań SE/snRNP U1

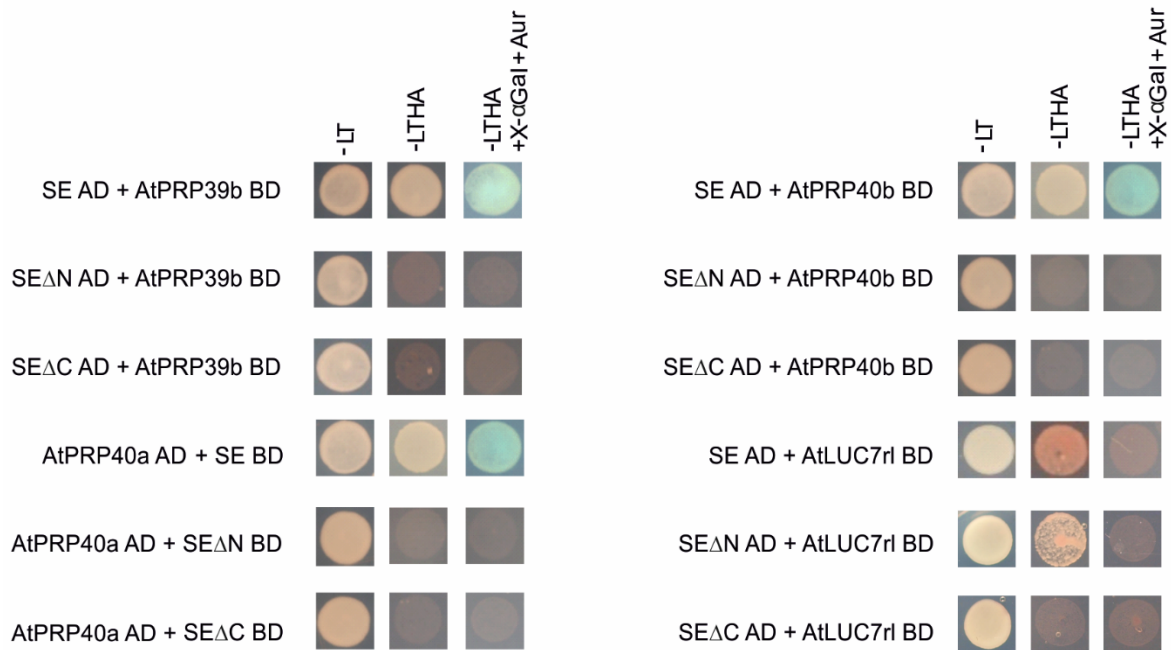
Analogicznie do analizy oddziaływań SE/AtCBC, przeprowadzono również identyfikację fragmentu SE odpowiedzialnego za wiązanie białek snRNP U1. Wykorzystano w tym celu w pierwszej kolejności dwuhybrydowy system drożdżowy. Przygotowano konstrukty kodujące SE z usuniętym nieustrukturyzowanym końcem aminowym (SE $\Delta$ N; brak aminokwasów 1-193) lub karboksylowym (SE $\Delta$ C; brak aminokwasów 544-720) (Ryc. 26), a następnie transformowano nimi komórki drożdżowe jednocześnie z konstrukcjami, z których powstawały AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b lub AtLUC7rl.



**Ryc. 26 Schemat wariantów białka SERRATE (SE) wykorzystywanych w analizach służących identyfikacji fragmentu odpowiedzialnego za oddziaływanie z partnerami białkowymi w kompleksie snRNP U1**

*SE<sub>1-720</sub>* – białko SE pełnej długości; *SE $\Delta$ N* – wariant białka SE z usuniętymi aminokwasami 1-193 (końcem aminowym); *SE $\Delta$ C* – wariant białka SE z usuniętymi aminokwasami 544-720 (końcem karboksylowym); liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym.

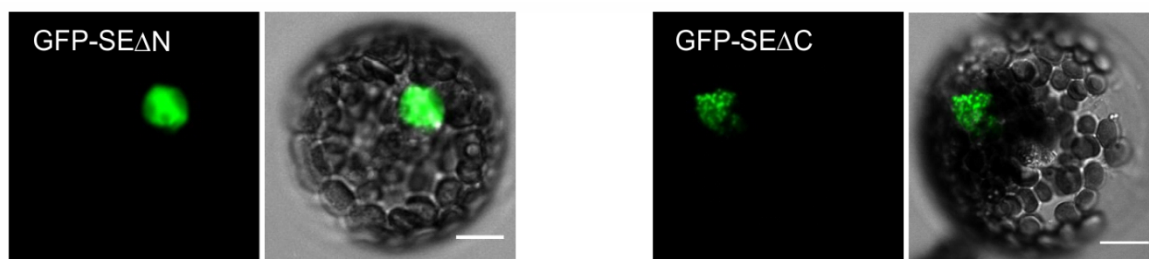
Wzrost komórek drożdżowych w trakcie tych eksperymentów zaobserwowano tylko dla wariantu SE z usuniętym końcem aminowym w przypadku jednoczesnej transformacji z AtLUC7rl (Ryc. 27). Ponownie w tym przypadku odnotowano aktywację tylko dwóch z czterech genów reporterowych, co miało również miejsce w trakcie eksperymentów poświęconych identyfikacji partnerów SE wśród wszystkich specyficznych białek snRNP U1 (Ryc. 16). Brak wzrostu drożdży w przypadku ekspresji SE z usuniętym nieustrukturyzowanym fragmentem karboksylowym wskazał na utratę oddziaływań takiego białka z wszystkimi czterema partnerami snRNP U1.



**Ryc. 27 Analiza oddziaływania między białkiem *SERRATE* (*SE*) w trzech wariantach: pełnej długości, wariantem pozbawionymi końca aminowego (*SEΔN*) lub karboksylowego (*SEΔC*) i wybranymi białkami kompleksu *snRNP U1* przy zastosowaniu dwuhybrydowego systemu drożdżowego**

*SE* – białko *SE* pełnej długości; *SEΔN* – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 1-193 (końcem aminowym); *SEΔC* – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 544-720 (końcem karboksylowym); *AD* – domena aktywująca czynnika transkrypcyjnego *Gal4*; *BD* – domena wiążąca DNA czynnika transkrypcyjnego *Gal4*; wzrost obserwowano na pożywce pozbawionej (-): leucyny (*L*), tryptofanu (*T*), histydyny (*H*), adeniny (*A*), z dodatkiem (+): *X-α-Gal*, *Aureobazydyny A* (*Aur*).

W kolejnym etapie badań sprawdzono lokalizację komórkową analizowanych wariantów *SE* (*SEΔN* lub *SEΔC*) w protoplastach *A. thaliana*. Zaobserwowano, że odcięcie któregośkolwiek z nieustrukturyzowanych fragmentów *SE* nie zaburza jego lokalizacji jądrowej (Ryc. 28). W przypadku usunięcia końca aminowego nie odnotowano już obecności specyficznych skupisk tego białka na terenie jądra komórkowego. Zaobserwowano w zamian sygnał homogeny na terenie całej nukleoplazmy.

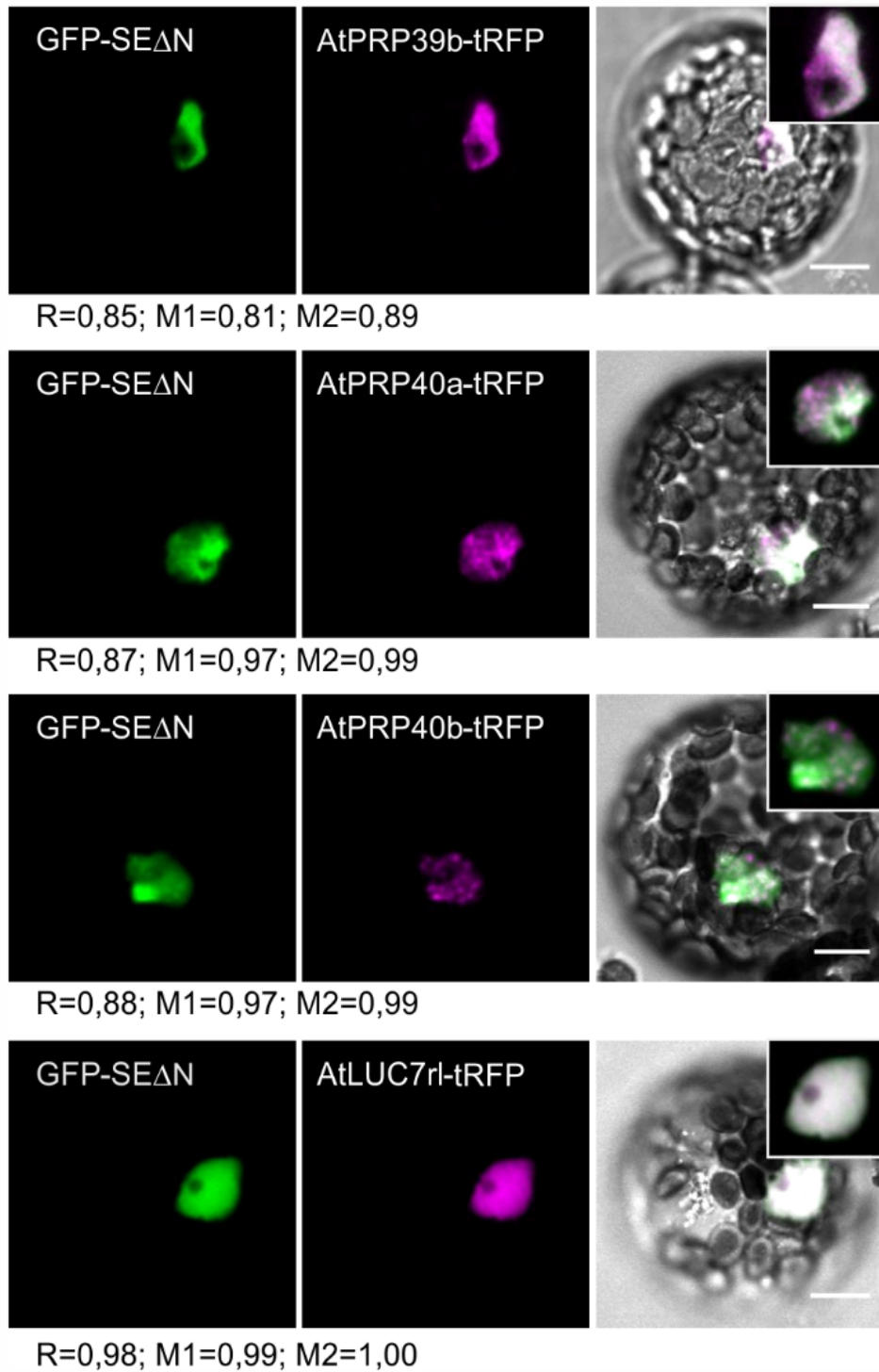


**Ryc. 28** Analiza lokalizacji wariantów białka *SERRATE* (*SE*), pozbawionych końca aminowego (*SEΔN*) lub karboksylowego (*SEΔC*) w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Skala równa 10  $\mu$ m.

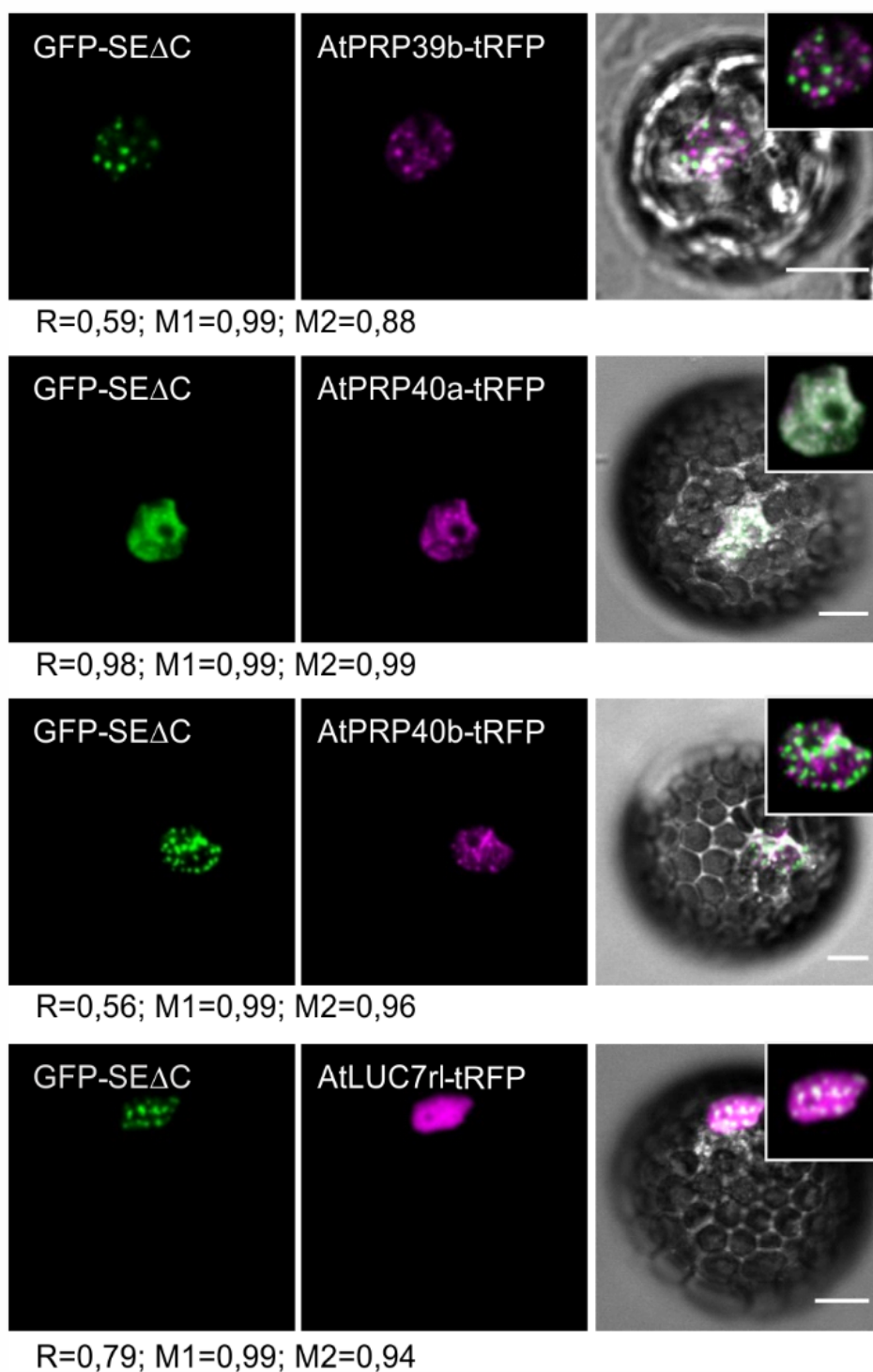
W obecności białek AtPRP40a-tRFP i AtPRP40b-tRFP wariant SE pozbawiony końca aminowego odtworzył jednak struktury, w których znajdowały się również wspomniane białka snRNP U1 (Ryc. 29). Wysokie wartości współczynników Pearson'a i Manders'a odnotowano również w przypadku jednoczesnej ekspresji SE $\Delta$ N i pozostałych analizowanych elementów tego kompleksu, tj. AtPRP39b, AtLUC7rl.

Usunięcie końca karboksylowego spowodowało natomiast całkowitą utratę ko-lokalizacji tej wersji SE z AtPRP39b, AtPRP40b i AtLUC7rl (Ryc. 30). Białka te znajdowały się w różnych skupiskach, znajdujących się na terenie jądra komórkowego, na co wskazuje również obniżona wartość współczynnika Pearson'a. W przypadku AtPRP40a odnotowano nadal wysoką ko-lokalizację z wariantem SE, pozbawionym fragmentu karboksylowego.



**Ryc. 29** Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka *SERRATE*, pozbawionego końca aminowego (*SE $\Delta$ N*) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład *snRNP U1* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.

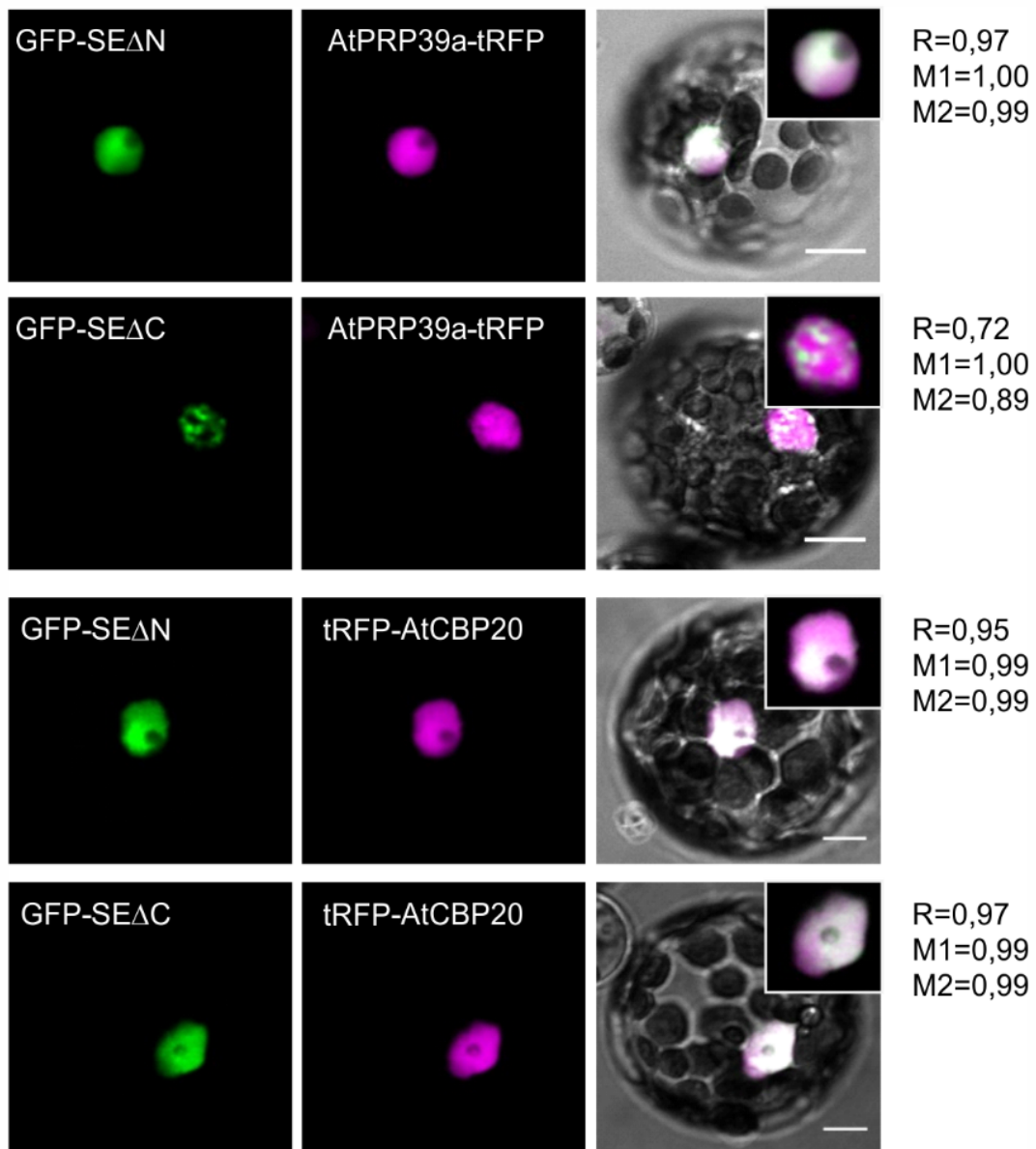


**Ryc. 30** Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka *SERRATE*, pozbawionego końca karboksylowego (*SE $\Delta$ C*) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.

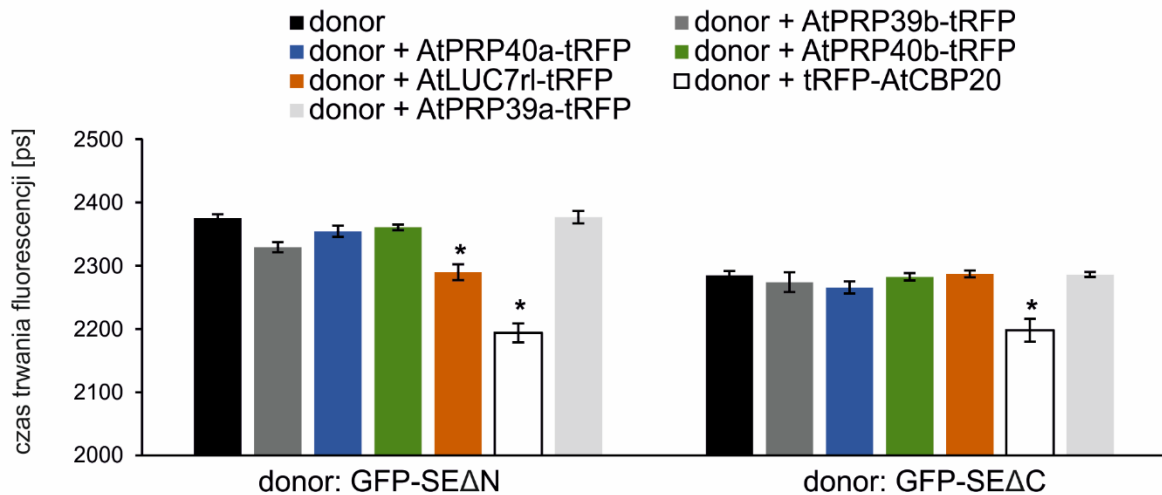
Obecność fluorescencyjnie znakowanych białek w protoplastach *A. thaliana* wykorzystano następnie w celu analizy bezpośrednich oddziaływań między analizowanymi wariantami SE i partnerami snRNP U1. Zastosowano ponownie kombinację technik FRET-FLIM. Dla pełnej wiarygodności uzyskanych wyników protoplasty transfekowano również konstruktami kodującymi jeden z wariantów SE w fuzji z GFP oraz APRP39a-tRFP lub tRFP-AtCBP20. AtPRP39a służyło w tych eksperymentach za kontrolę negatywną, gdyż wyniki uzyskane przy zastosowaniu dwuhybrydowego systemu drożdżowego wskazywały na brak bezpośrednich oddziaływań tego białka z SE (Ryc. 16). Na podstawie wcześniejszych analiz, wytypowano AtCBP20 na kontrolę pozytywną, gdyż wykazano, że ustrukturyzowany rdzeń, obecny w każdym wariantcie SE po odcięciu nieustrukturyzowanych fragmentów, jest wystarczający do związania AtCBP20 (Ryc. 15). Po transfekcji protoplastów konstruktami kodującymi wspomniane warianty SE w fuzji z GFP oraz AtPRP39a lub AtCBP20 w fuzji z tRFP zaobserwowano nakładające się na siebie sygnały w jądrze komórkowym (Ryc. 31), pozwalające na przeprowadzenie eksperymentów poświęconych bezpośrednim oddziaływaniam.

W trakcie prowadzenia analiz FRET-FLIM mierzono czas trwania fluorescencji donorów, za które posłużyły warianty SE w fuzji z GFP (Ryc. 32). Usunięcie nieustrukturyzowanych końców SE spowodowało brak istotnej zmiany czasu trwania fluorescencji obydwóch donorów w obecności AtPRP39b, AtPRP40a i AtPRP40b, wskazując na brak oddziaływań między analizowanymi komponentami. Tylko w przypadku białek AtLUC7rl i SE z usuniętym końcem aminowym spadek taki był nadal obserwowalny. Wyniki te wskazują na kluczową rolę nieustrukturyzowanych fragmentów SE w wiązaniu AtPRP39b, AtPRP40a i AtPRP40b. Potwierdziły tym samym rezultaty uzyskane w dwuhybrydowym systemie drożdżowym (Ryc. 27). Co więcej, AtPRP39a-tRFP nie wykazywało zdolności do odbierania energii analizowanym białkom donorowym. Transfer energii zarejestrowano natomiast w przypadku transfekcji protoplastów konstruktami kodującymi warianty SE w fuzji z GFP i tRFP-AtCBP20. Wyniki te wskazują na poprawne zwinięcie się i funkcjonalność analizowanych wariantów SE w protoplastach *A. thaliana*.



**Ryc. 31** Analiza wzajemnej lokalizacji wariantów białka *SERRATE*, pozbawionych końca aminowego (*SE $\Delta$ N*) lub karboksylowego (*SE $\Delta$ C*) z *AtPRP39a* i *AtCBP20* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.



**Ryc. 32** Analiza oddziaływania między wariantami białka *SERRATE*, pozbawionymi końca aminowego (*SEΔN*) lub karboksylowego (*SEΔC*) i wybranymi białkami kompleksu *snRNP U1* lub *AtCBP20* przy zastosowaniu *FRET-FLIM* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

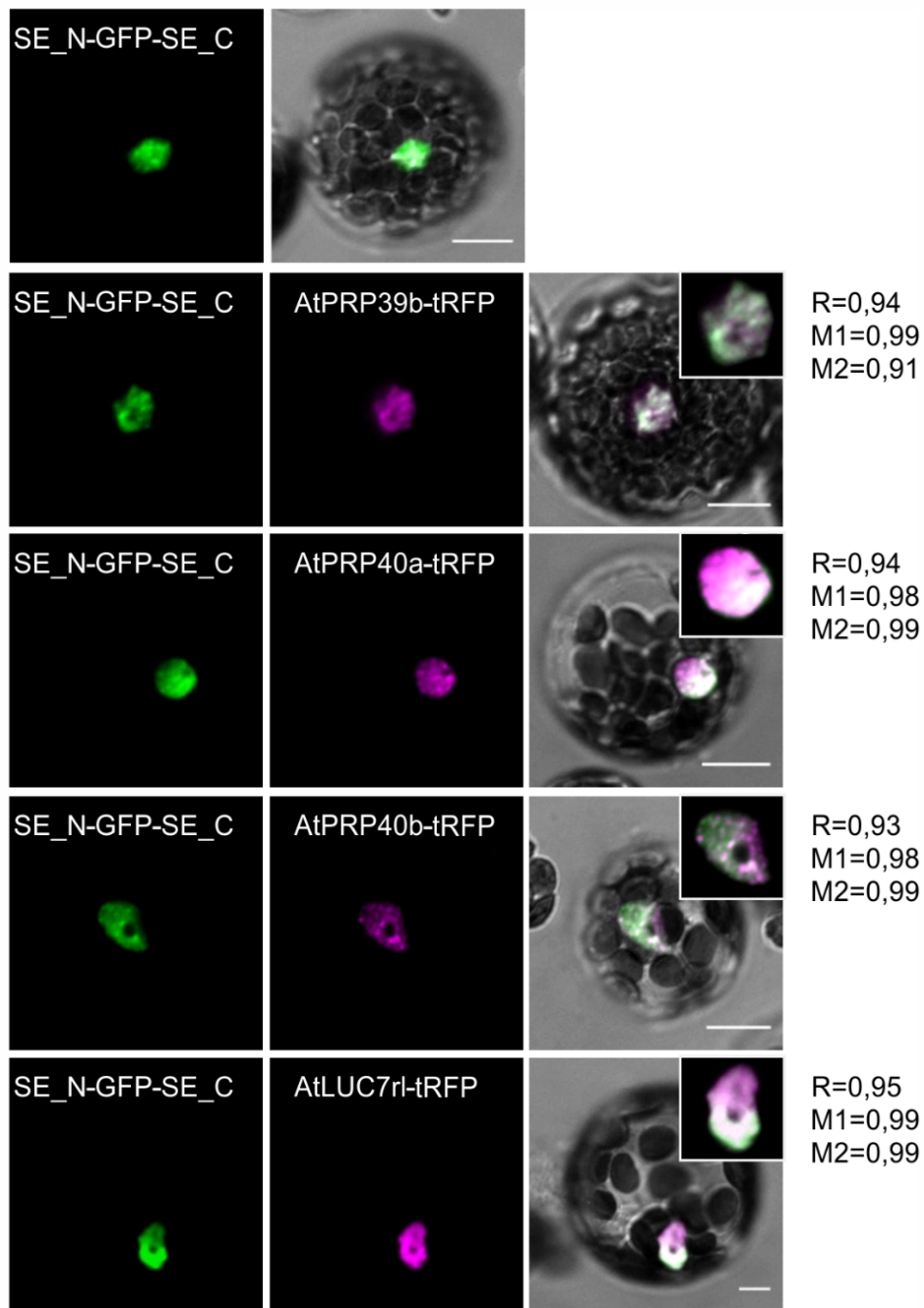
Donor - GFP w fuzji z wariantami *SERRATE* (*GFP- SEΔN*; *GFP- SEΔC*); *SEΔN* – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 1-193 (końcem aminowym); *SEΔC* – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 544-720 (końcem karboksylowym); Akceptor - *tRFP*, *tagRFP* (*tRFP*) w fuzji z białkami *AtPRP39b*, *AtPRP40a*, *AtPRP40b*, *AtLUC7rl*, *AtPRP39a* lub *AtCBP20*; słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (*SEM*, standard error of the mean;  $n > 10$ ); gwiazdki wskazują istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora ( $*p < 0,001$ ).

W celu wykluczenia udziału ustrukturyzowanego rdzenia *SE* w wiązaniu białek *snRNP U1*, przygotowano kolejny konstrukt, w którym GFP znajdowało się pomiędzy nieustrukturyzowanymi fragmentami *SE* (*SE\_N-GFP-SE\_C*) (Ryc. 33). Konstrukt ten następnie wprowadzono do protoplastów *A. thaliana* na drodze przejściowej transfekcji i wykorzystano w pierwszej kolejności w analizach wzajemnej lokalizacji z partnerami *snRNP U1* (Ryc. 34).



**Ryc. 33** Schemat wariantu białka *SERRATE* (*SE*) wykorzystywanego w analizach służących ocenie roli ustrukturyzowanego rdzenia w oddziaływaniu z partnerami białkowymi w kompleksie *snRNP U1*

liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym; *SE\_N-GFP-SE\_C* odpowiada resztom aminokwasowym *SE* 1-194– *GFP-SE* 544-720.

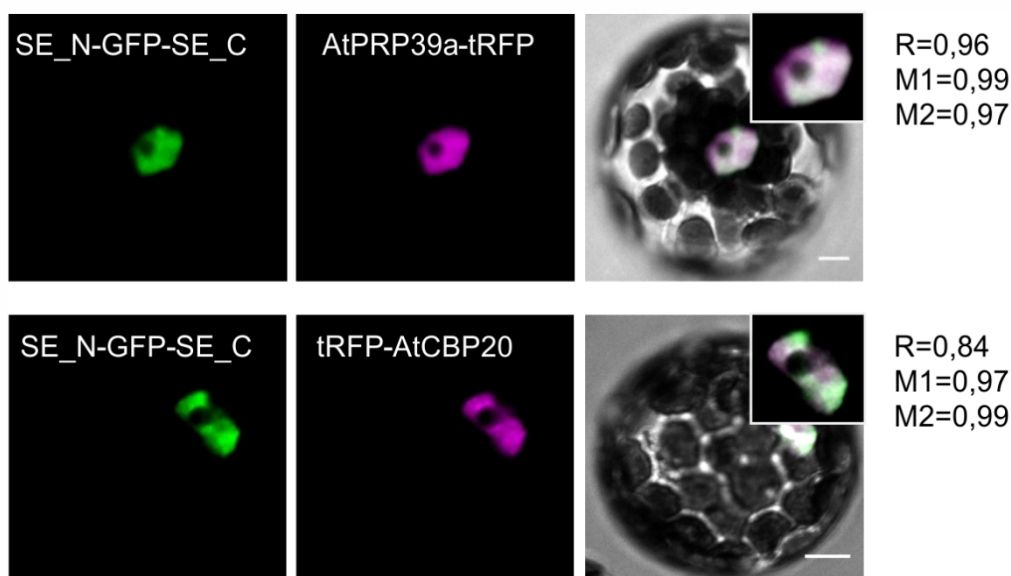


**Ryc. 34** Analiza wzajemnej lokalizacji nieustrukturyzowanych fragmentów białka *SERRATE* (SE) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

SE\_N-GFP-SE\_C odpowiada resztom aminokwasowym SE 1-194-GFP- SE 544-720; tRFP, tagRFP; R, współczynnik Pearson'a; M1 i M2, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.

Niestrukturyzowane fragmenty SE były wystarczającą jego częścią do przyjęcia przez to białko lokalizacji jądrowej (Ryc. 34). Co więcej, fragmenty te tworzyły specyficzne dla SE skupiska i wykazywały wysoki stopień wzajemnej lokalizacji z analizowanymi białkami snRNP U1.

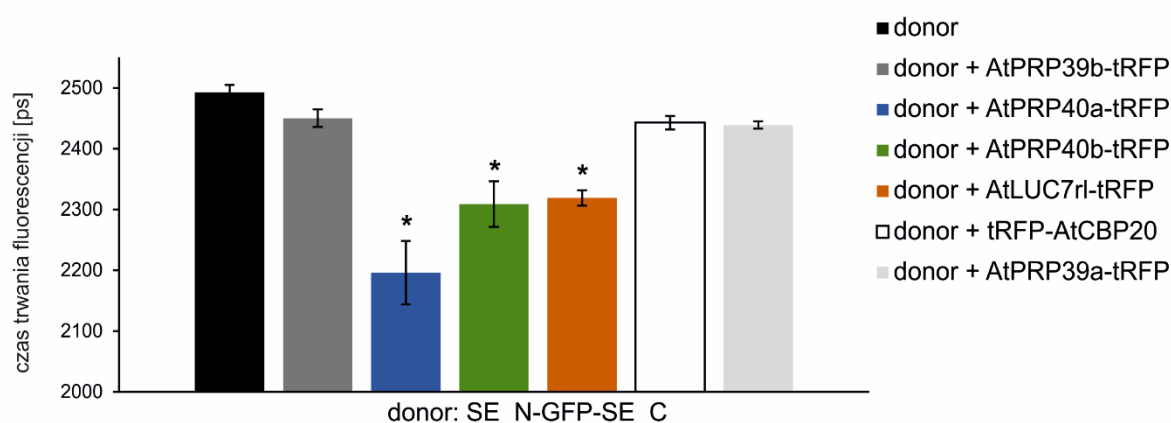
W następnym etapie przeprowadzono analizy oddziaływań typu białko-białko przy zastosowaniu FRET-FLIM. Wykorzystano w tych eksperymentach GFP rozdzielające niestrukturyzowane fragmenty SE, jako donor energii oraz ponownie AtPRP39a i AtCBP20 w fuzji z tRFP jako próby kontrolne. Drugie z wymienionych białek służyło w tym przypadku, przeciwnie do poprzednich eksperymentów, również jako kontrola negatywna, ze względu na brak wymaganego dla jego wiązania ustrukturyzowanego rdzenia w analizowanym wariantcie SE. Zarówno AtPRP39a jak i AtCBP20 w wysokim stopniu ko-lokalizowały z niestrukturyzowanymi fragmentami SE w jądrze komórkowym protoplastów *A. thaliana* (Ryc. 35), stąd po raz kolejny okazały się być odpowiednimi białkami kontrolnymi dla analiz typu FRET-FLIM.



**Ryc. 35** Analiza wzajemnej lokalizacji niestrukturyzowanych fragmentów białka *SERRATE* (SE) z *AtPRP39a* i *AtCBP20* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*SE\_N-GFP-SE\_C* odpowiada resztom aminokwasowym SE 1-194 –GFP– SE 544-720; *tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.

Pomiary czasu trwania fluorescencji donora (SE\_N-GFP-SE\_C) wykazały, że nieustrukturyzowane fragmenty SE są nie tylko wystarczające dla lokalizacji z partnerami U1, ale również dla ich wiązania, gdyż zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie czasu trwania fluorescencji białka donorowego w obecności AtPRP40a, AtPRP40b lub AtLUC7rl (Ryc. 36). Wyjątkiem okazało się być białko AtPRP39b, które nie przyczyniało się do odbierania energii donorowi. Sytuacja taka miała również miejsce, gdy SE\_N-GFP-SE\_C ulegał ekspresji jednocześnie z tRFP-AtCBP20 lub AtPRP39a-tRFP. Wyniki te wykazały więc, że nieustrukturyzowane fragmenty SE są wystarczające dla oddziaływania z trzema z czterech partnerów snRNP U1, tj. AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl.



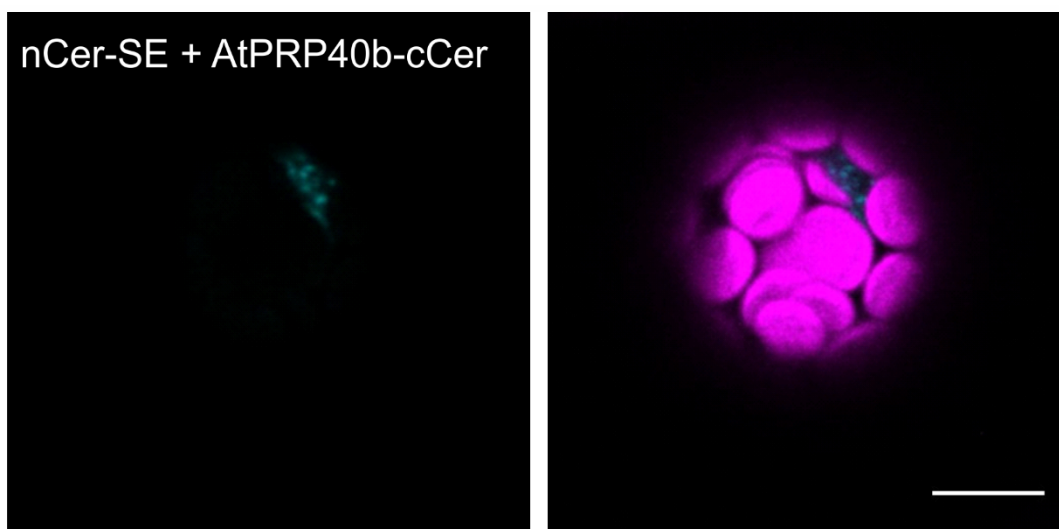
**Ryc. 36 Analiza oddziaływania między nieustrukturyzowanymi fragmentami białka *SERRATE* (SE) i wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 oraz AtCBP20 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

Donor – GFP w fuzji z nieustrukturyzowanymi fragmentami SE; SE\_N-GFP-SE\_C odpowiada resztom aminokwasowym SE 1-194 –GFP– SE 544-720; Akceptor - tRFP, tagRFP (tRFP) w fuzji z białkami AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b, AtLUC7rl, AtPRP39a lub AtCBP20; słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM, standard error of the mean;  $n > 10$ ); gwiazdki wskazują istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora ( $*p < 0,001$ ).

Ze względu na to, że partnerami SE wśród snRNP U1 okazały się być białka pomocnicze tego kompleksu a nie białka podstawowe, tj. U1A, U1C i U1-70K, w kolejnym etapie badań sprawdzono, czy do zidentyfikowanych oddziaływań dochodzi w obecności pozostałych elementów snRNP U1. Prowadzono w tym celu eksperymenty w transfekowanych protoplastach *A. thaliana* stosując kombinację technik mikroskopowych BiFC i FRET-FLIM. Wybrano AtPRP40b, jako białko reprezentujące

partnerów SE wśród snRNP U1 oraz AtU1A, jako jedno z podstawowych elementów tego kompleksu. Oddziaływanie SE/AtPRP40b pozwalało na odtworzenie struktury białka fluorescencyjnego Cerulean (BiFC), które jednocześnie wykorzystywano, jako donor energii w trakcie pomiarów FRET-FLIM. Jako akceptor stosowano białka powstające w fuzji z tRFP.

W pierwszej kolejności protoplasty *A. thaliana* transfekowano konstruktami kodującymi SE z dołączonym fragmentem aminowym i AtPRP40b z fragmentem karboksylowym Cerulean. W wyniku tego zarejestrowano sygnał jądrowy w postaci skupisk, charakterystycznych dla SE i AtPRP40b (Ryc. 37).

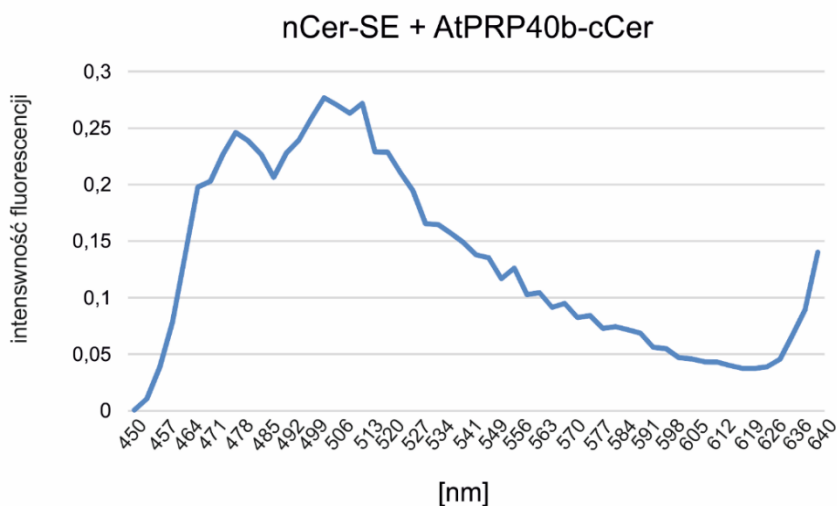


**Ryc. 37 Lokalizacja białka fluorescencyjnego Cerulean (Cer), powstałego w wyniku oddziaływania białka SERRATE (SE) z AtPRP40b w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

*nCer* – fragment aminowy Cerulean; *cCer* – fragment karboksylowy Cerulean; prawy panel to obraz autofluorescencji chloroplastów z nałożonym sygnałem Cerulean (lewy panel); skala równa 10  $\mu$ m.

Następnie zbadano widmo emisji i czas trwania fluorescencji tak uzyskanego białka fluorescencyjnego w celu potwierdzenia odpowiednich jego właściwości, jako donora energii w analizach FRET-FLIM. Po wzbudzeniu go laserem o długości fali 440 nm, zaobserwowano dwa główne piki emisji fluorescencji przy długości fali około 470 nm i 500 nm (Ryc. 38). Przy długości fali równej 555 nm, odpowiadającej maksimum absorpcji fluorescencji białka tRFP, zarejestrowano około 50% intensywności sygnału

emisji Cerulean, stąd białko to wykazywało odpowiednie właściwości donorowe w parze Cerulean-tRFP. Średni czas trwania fluorescencji odtworzonego donora wynosił  $2697,14 \pm 27,41$  ps.

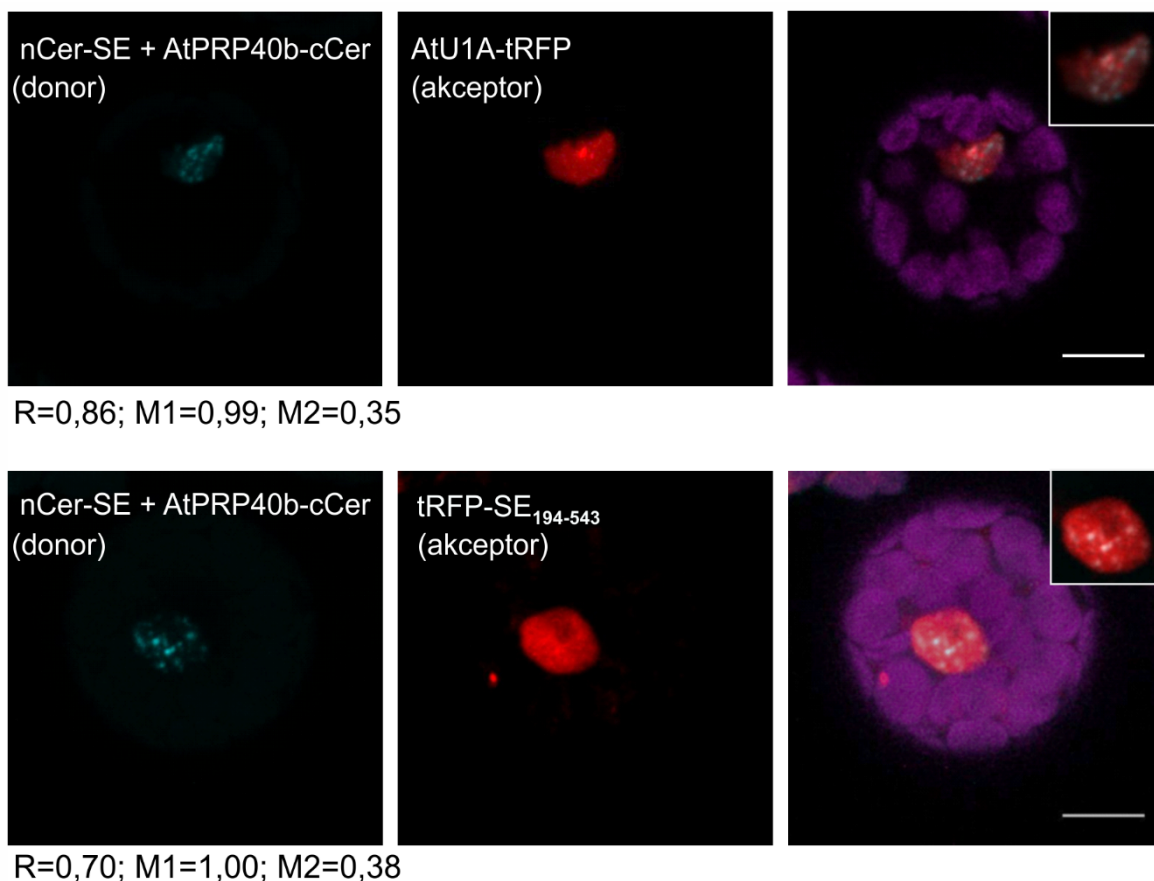


**Ryc. 38** Widmo emisji fluorescencji białka Cerulean (Cer), powstałego w wyniku oddziaływania białka SERRATE (SE) z AtPRP40b w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*nCer* – fragment aminowy Cerulean; *cCer* – fragment karboksylowy Cerulean; wartości intensywności fluorescencji podano w jednostkach arbitralnych.

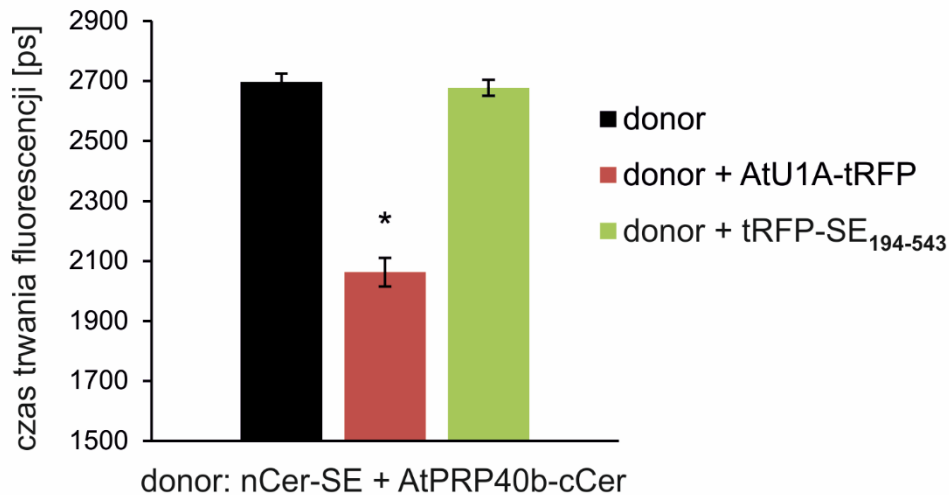
Czas trwania fluorescencji Cerulean, odtworzonego przez oddziaływanie SE/AtPRP40b, mierzono również w obecności potencjalnego białka akceptorowego, którym było AtU1A-tRFP. Wszystkie trzy białka znajdowały się w jądrze komórkowym transfekowanych protoplastów *A. thaliana* i wykazywały częściową ko-lokalizację (Ryc. 39). Ze względu na dodatkową obecność AtU1A-tRFP w strukturach wolnych od SE i AtPRP40b, uzyskano niską wartość współczynnika Manders'a dla kanału białka AtU1A-tRFP (M2). Pomimo tego, zarejestrowano znaczne skrócenie czasu trwania fluorescencji Cerulean w przypadku jednoczesnej ekspresji trzech wspomnianych białek w protoplastach *A. thaliana* (Ryc. 40). W celu wykluczenia niespecyficznego obniżenia wartości czasu trwania fluorescencji, zastosowano również kontrolę negatywną w postaci ustrukturyzowanego fragmentu SE (reszty aminokwasowe 194-543) w fuzji z tRFP. Fragment ten, zgodnie z wynikami poprzednich eksperymentów, nie jest odpowiedzialny za oddziaływanie z białkami snRNP U1 (Ryc. 27, 32, 36). Obecność tRFP-SE<sub>194-543</sub> w nukleoplazmie i częściowo w cytoplazmie (Ryc. 39) nie powodowała istotnych zmian

czasu trwania fluorescencji odtworzonego Cerulean (Ryc. 40), wskazując jednoznacznie na specyficzność oddziaływań między SE, AtPRP40b i AtU1A.



**Ryc. 39** Analiza wzajemnej lokalizacji białka Cerulean (Cer), powstałego w wyniku oddziaływania między białkiem *SERRATE* (SE) i *AtPRP40b*, z *AtU1A-tRFP* lub ustrukturyzowanym fragmentem SE (*SE<sub>194-543</sub>*) w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

*nCer* – fragment aminowy Cerulean; *cCer* – fragment karboksylowy Cerulean; prawy panel to obraz autofluorescencji chloroplastów z nałożonym sygnałem Cerulean (lewy panel); *tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10 µm.



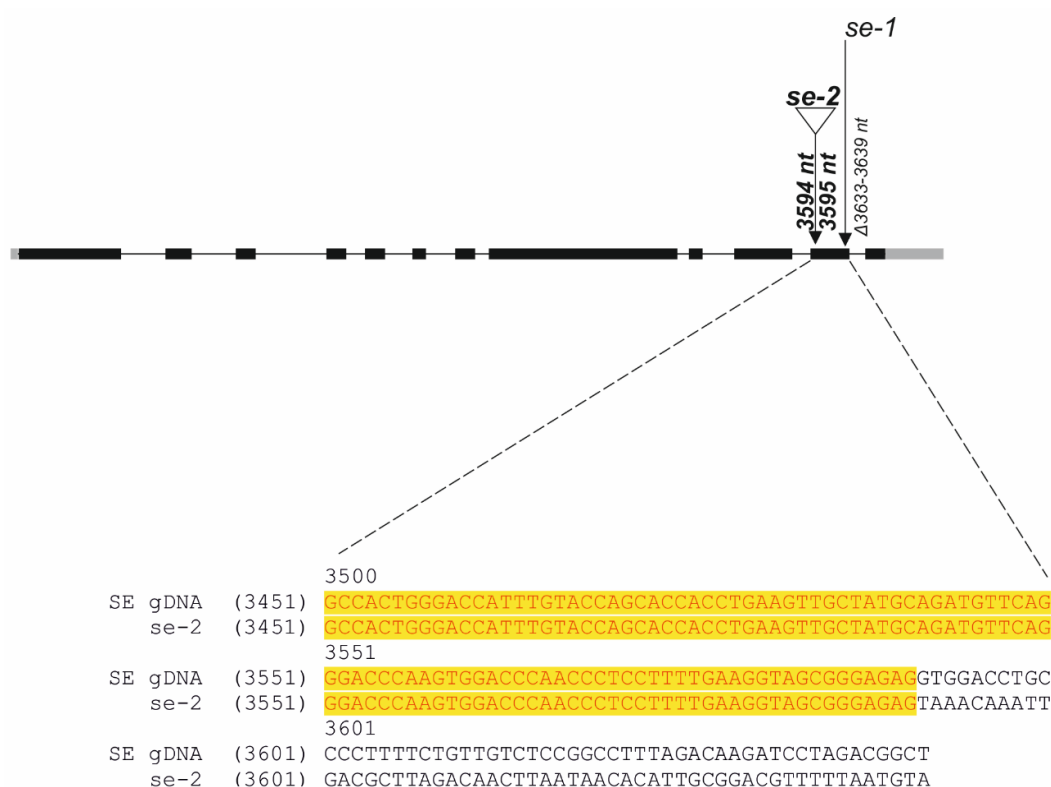
**Ryc. 40** Analiza oddziaływania między kompleksem *SERRATE* (SE)/*AtPRP40b* oraz *AtU1A* przy zastosowaniu kombinacji BiFC i FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Donor – białko fluorescencyjne Cerulean utworzone wskutek oddziaływań między nCer-SE i *AtPRP40b-cCer*; Akceptor – tagRFP (tRFP) w fuzji z białkami *AtU1A* lub ustrukturyzowanym fragmentem SE (SE<sub>194-543</sub>; liczy odpowiadają resztom aminokwasowym); słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM, standard error of the mean;  $n > 10$ ); gwiazdki wskazują istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora ( $*p < 0,001$ ).

#### 5.4. Rola oddziaływań SE/snRNP U1 w biogenezie miRNA

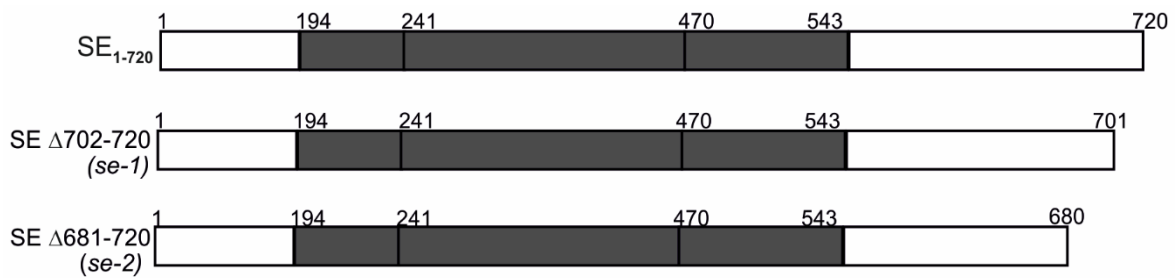
Dotychczasowe wyniki badań prowadzonych m.in. w Zakładzie Ekspresji Genów UAM sugerowały, że oddziaływania między elementami maszynarii biogenezy miRNA i splicingu regulują powstawanie miRNA z genów zawierających w swojej strukturze introny (Bielewicz i in., 2013; Schwab i in., 2013). W celu sprawdzenia, czy regulacja ta jest wynikiem oddziaływań między SE i elementami snRNP U1, w pierwszej kolejności postanowiono scharakteryzować dostępne mutanty SE *A. thaliana* pod względem wspomnianych oddziaływań. Wybrano dwie linie roślin, tj. *se-1* i *se-2*, w których mutacje, zaburzające strukturę SE, znajdują się w sekwencji kodującej nieustrukturyzowany karboksylowy fragment białka. Pomimo tego, że zgodnie z danymi literaturowymi i uzyskanymi w niniejszej pracy, mutacje te znajdują się poza rejonem odpowiedzialnym za oddziaływanie z DCL1, HYL1 oraz AtCBC (Machida i in., 2011, Iwata i in., 2013) (Ryc. 15), w obydwóch tych liniach rejestrowano obniżony poziom wielu miRNA (Prigge

i Wagner, 2001; Grigg i in., 2006; Zieleziński i in., 2015). W mutacji *se-1* wskutek usunięcia siedmiu nukleotydów powstaje przedwczesny kodon stop i białko jest krótsze o 40 aminokwasów (Prigge i Wagner, 2001). Linia *se-2* zawiera w strukturze *SE* insercję T-DNA, której lokalizację należało dokładnie ustalić, gdyż dostępne były tylko informacje o przybliżonym miejscu uszkodzenia tego genu (Grigg i in., 2006). W tym celu przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem genomowego DNA i pary starterów, z których jeden hybrydował do sekwencji ósmego egzonu *SE*, a drugi do insercji T-DNA. Uzyskany produkt następnie oczyszczono i sekwencjonowano. Wynikiem tych analiz było ustalenie miejsca insercji T-DNA w mutacji *se-2* między 3594 i 3595 nukleotydem sekwencji genomowej, co odpowiada 2041 i 2042 nukleotydom sekwencji kodującej (Ryc. 41). Białko *SE* jest więc w tym mutacji krótsze o 40 aminokwasów od wersji natywnej i o 20 aminokwasów względem białka w *se-1* (Ryc. 42).



**Ryc. 41 Lokalizacja insercji T-DNA w genie kodującym białko *SERRATE* (*SE*) w mutacji *se-2* *Arabidopsis thaliana***

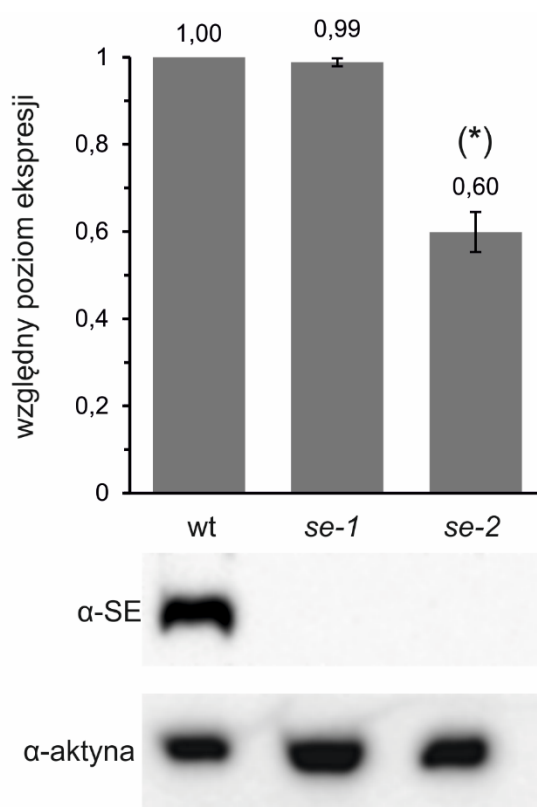
strzałkami zaznaczono miejsce insercji T-DNA (*se-2*) lub delecji nukleotydów (*se-1*) oznaczonych liczbami; dolny panel wskazuje przyrównanie fragmentu sekwencji genomowego DNA *SE* (*SE gDNA*) z sekwencją genomową występującą w *se-2* – na żółto zaznaczono fragment wspólny dla obydwóch sekwencji.



**Ryc. 42 Schemat wariantów białka *SERRATE* (*SE*) w roślinach typu dzikiego i w mutantach *SE* (*se-1*, *se2*), wykorzystywanych w analizach służących ocenie roli brakujących fragmentów *SE* w oddziaływaniu z partnerami *snRNP U1* i w biogenezie *miRNA***

*SE*<sub>1-720</sub> – białko *SE* pełnej długości; *SE* $\Delta$ 702-720 – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 702-720 (*se-1*); *SE* $\Delta$ 681-720 – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 681-720 (*se-2*); liczby odpowiadają odpowiednim resztom aminokwasowym.

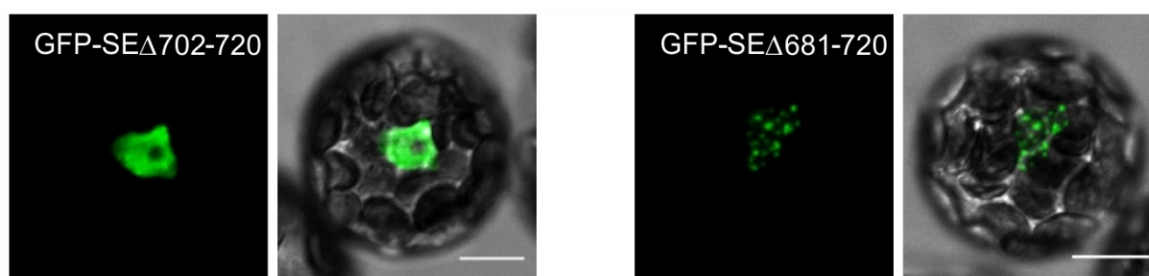
Wykonano również analizę poziomu ekspresji *SE* w liściach 30-dniowych roślin wspomnianych mutantów. Eksperymenty przeprowadzone przy zastosowaniu PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) wykazały, że ilość mRNA *SE* nie zmienia się w *se-1* i obniża się o 40% w *se-2* względem roślin typu dzikiego (*wt*) (Ryc. 43). Podjęto również próbę oceny poziomu białka *SE* w tych mutantach, jednakże po nałożeniu ekstraktów o zawartości 30  $\mu$ g białka i przy zastosowaniu komercyjnie dostępnego przeciwciała (Agrisera, AS09 532A), w ścieżkach odpowiadających *se-1* i *se-2* nie zarejestrowano żadnego sygnału. W celu produkcji wspomnianego przeciwciała, wykorzystano peptyd *SE*, znajdujący się na karboksylowym końcu białka (dr Joanna Porankiewicz-Asplund, konsultacja ustna). Z tego powodu, jak również na podstawie doniesienia o letalnym charakterze całkowitego wyciszenia *SE*, powyższy wynik zinterpretowano jako skutek nieobecności antygeny, wykorzystanego w trakcie produkcji przeciwciał, w skróconych wersjach *SE*. Ocena ilości białka *SE* w mutantach *se-1* i *se-2* była więc niemożliwa.



**Ryc. 43 Analiza poziomu ekspresji SE w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach *se-1* i *se-2* przy zastosowaniu PCR w czasie rzeczywistym i Western blot**

Górny panel przedstawia wynik analizy poziomu transkryptu SE w wartościach znormalizowanych do poziomu mRNA GAPDH, w odniesieniu do poziomu w roślinach dzikich (wt); Gwiazdką w nawiasie zaznaczono wynik analizy istotności różnicy między próbą kontrolną i badaną. Analizę tą wykonano na wartościach znormalizowanych do poziomu mRNA GAPDH; \*  $p < 0,05$ ; Dolny panel przedstawia wynik analizy Western blot po nałożeniu na żel ekstraktów roślinnych z wt i mutantów SE o zawartości 30  $\mu\text{g}$  białek i zastosowaniu przeciwciał specyficznych do fragmentu SE ( $\alpha$ -SE) i aktyny ( $\alpha$ -aktyna; kontrola nałożenia).

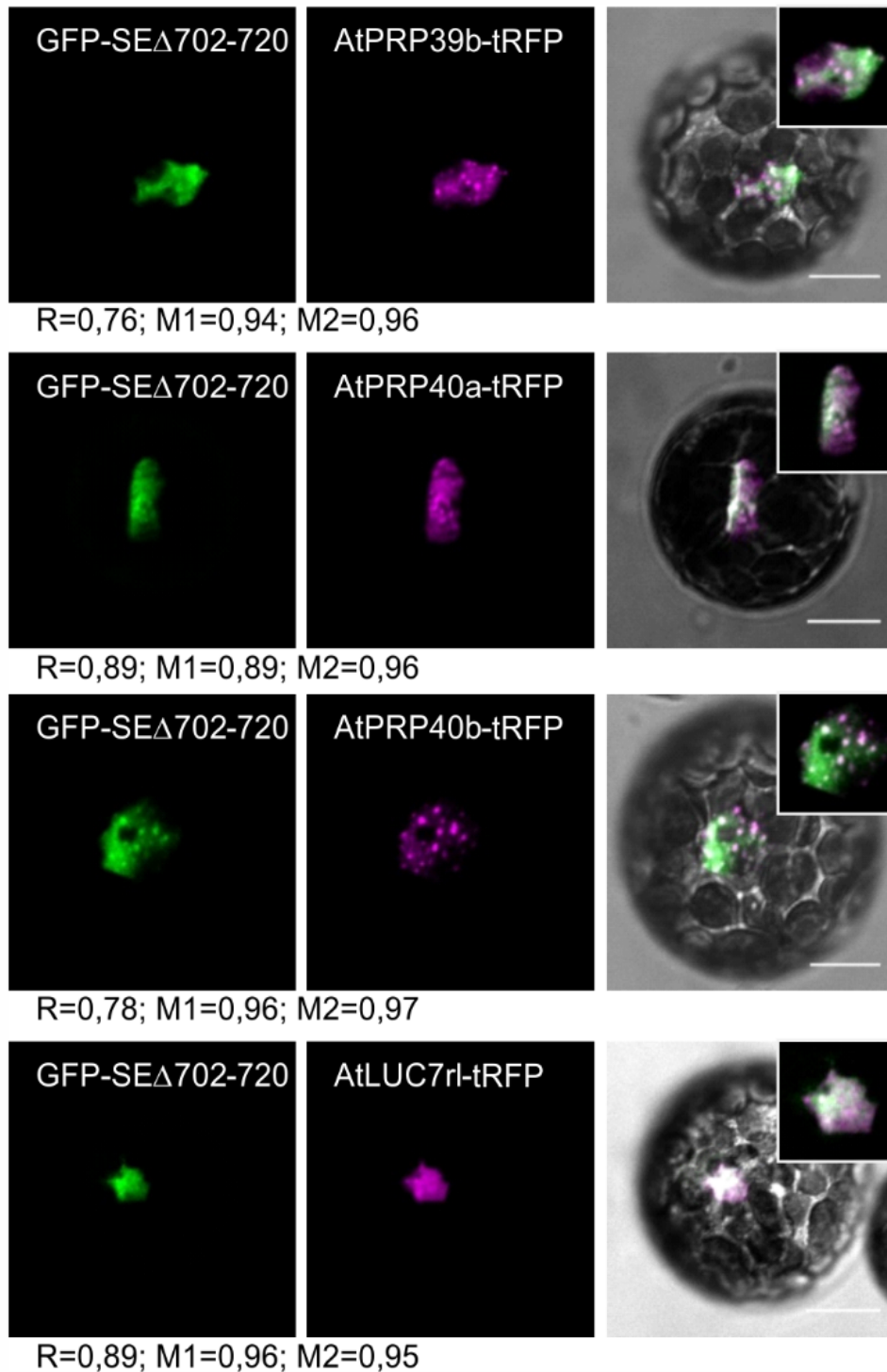
W kolejnym etapie sprawdzono lokalizację komórkową wariantów SE, powstających w *se-1* i *se-2*. W tym celu protoplasty *A. thaliana* transfekowano konstrukcjami kodującymi badane białka w fuzji z GFP. Zaobserwowano, że obydwa te białka znajdują się w jądrze komórkowym, jak również, że po odcięciu 20 aminokwasów (wariant w *se-1*) sygnał jest bardziej homogenny w porównaniu z obrazem uzyskanym po transfekcji protoplastów konstruktem kodującym wersję SE z *se-2* (Ryc. 44).



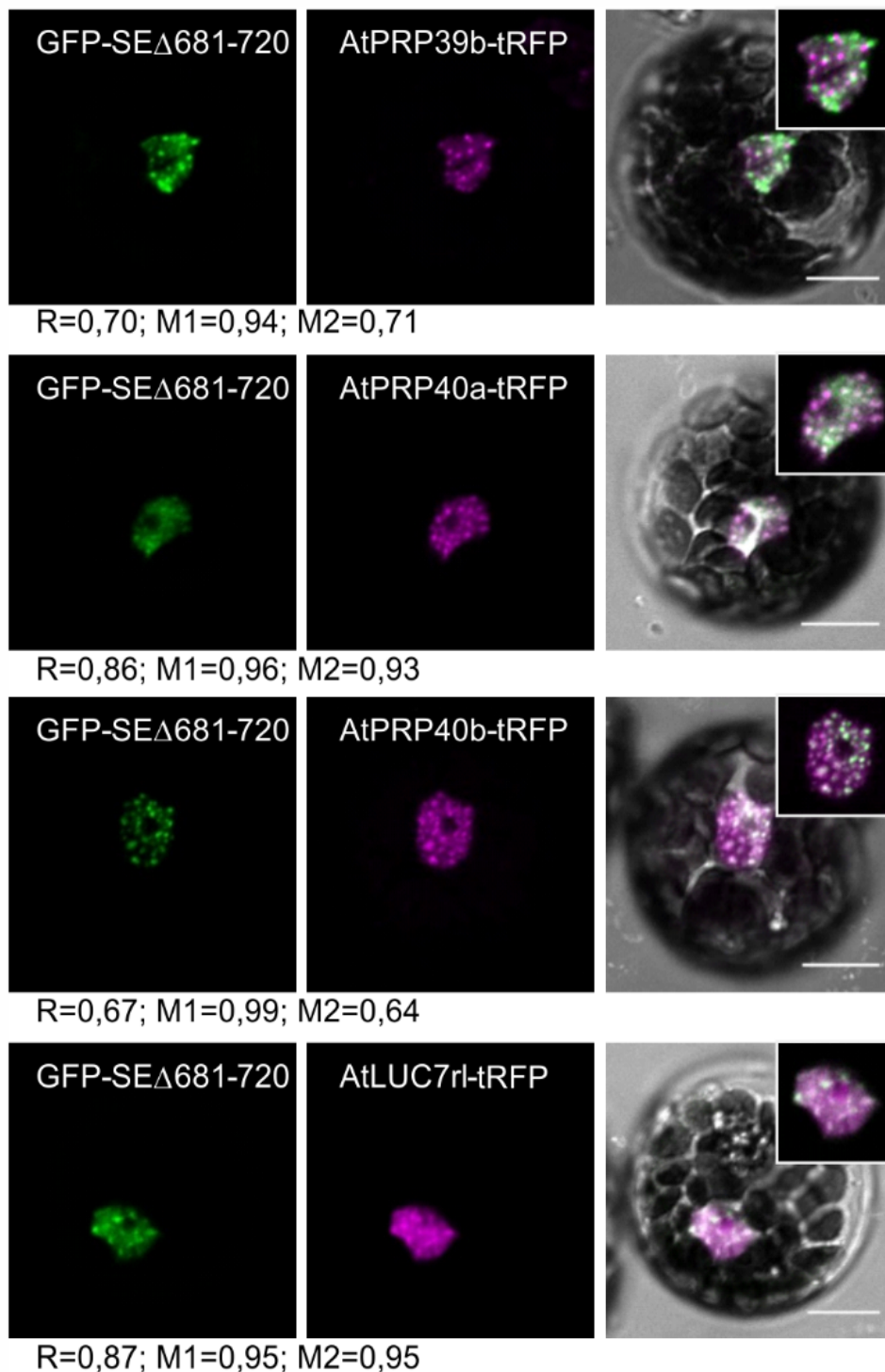
**Ryc. 44 Analiza lokalizacji wariantów białka *SERRATE* (*SE*) pozbawionych 20 (*SEΔ702-720*) lub 40 (*SEΔ681-720*) aminokwasów z końca karboksylowego w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

*SEΔ702-720* – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 702-720 (odpowiada białku *SE* w mutancie *se-1*); *SEΔ681-720* – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 681-720 (odpowiada białku *SE* w mutancie *se-2*); skala równa 10  $\mu\text{m}$ .

W obecności partnerów snRNP U1 wariant odpowiadający *se-1* przyjął jednakże ponownie charakterystyczną dla *SE* lokalizację w skupiskach, w których znajdowały się również białka z kompleksu splicingowego (Ryc. 45). W przypadku wariantu *SE* z mutanta *se-2*, białko to przy jednoczesnej ekspresji partnerów snRNP U1 wykazywało się również sygnałem ziarnistym. Współczynniki ko-lokalizacji tych elementów przyjęły jednakże niższe wartości w porównaniu z wariantem z *se-1* (Ryc. 45 i 46).

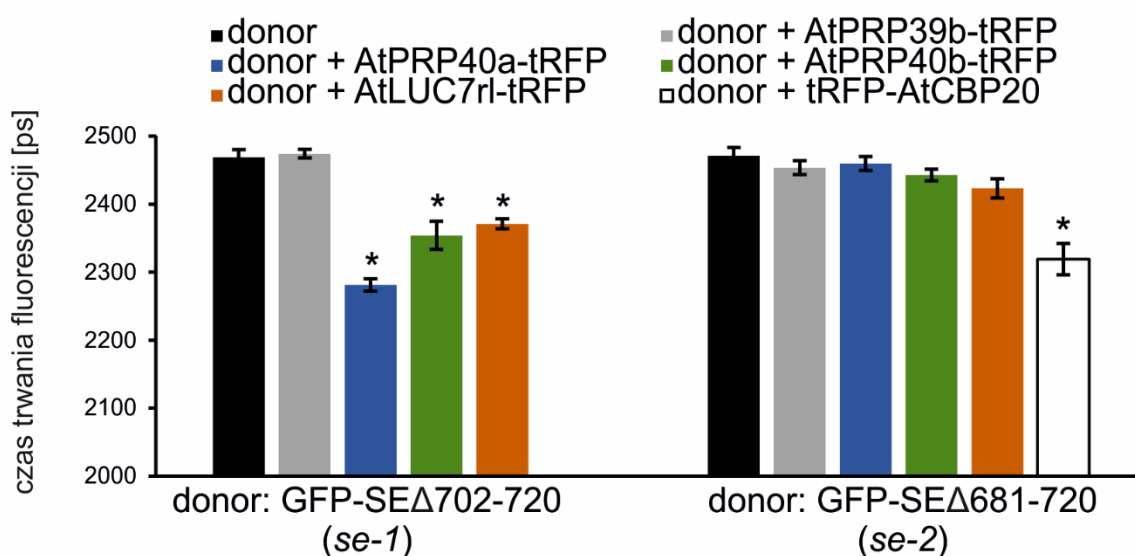


**Ryc. 45** Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka *SERRATE* (*SE*) pozbawionego 20 aminokwasów z końca karboksylowego (*SE* $\Delta$ 702-720) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład *snRNP U1* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana*. *SE* $\Delta$ 702-720 – wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 702-720 (odpowiadają białku *SE* w mutancie *se-1*); *tRFP*, *tagRFP*; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.



**Ryc. 46** Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka *SERRATE* (*SE*) pozbawionego 40 aminokwasów z końca karboksylowego (*SE* $\Delta$ 681-720) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład *snRNP U1* w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana* *SE* $\Delta$ 681-720 - wariant białka *SE* z usuniętymi aminokwasami 681-720 (odpowiada białku *SE* w mutancie *se-2*); *tRFP*, tagRFP; *R*, współczynnik Pearson'a; *M1* i *M2*, współczynniki Manders'a; skala równa 10  $\mu$ m.

W celu ustalenia czy warianty SE powstające w *se-1* i *se-2* są nadal zdolne do oddziaływania z partnerami snRNP U1, przeprowadzono eksperymenty typu FRET-FLIM, wykorzystując warianty białka SE w fuzji z GFP jako donor energii. W przypadku *se-1* zarejestrowano istotny spadek czasu trwania fluorescencji w obecności trzech z czterech partnerów snRNP U1, tj. AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl (Ryc. 47). Białko odpowiadające wariantowi SE w *se-2* przekazywało energię na istotnym poziomie tylko w obecności tRFP-AtCBP20, co wskazuje na utratę oddziaływań między snRNP U1 i białkiem SE w mutancie *se-2*.

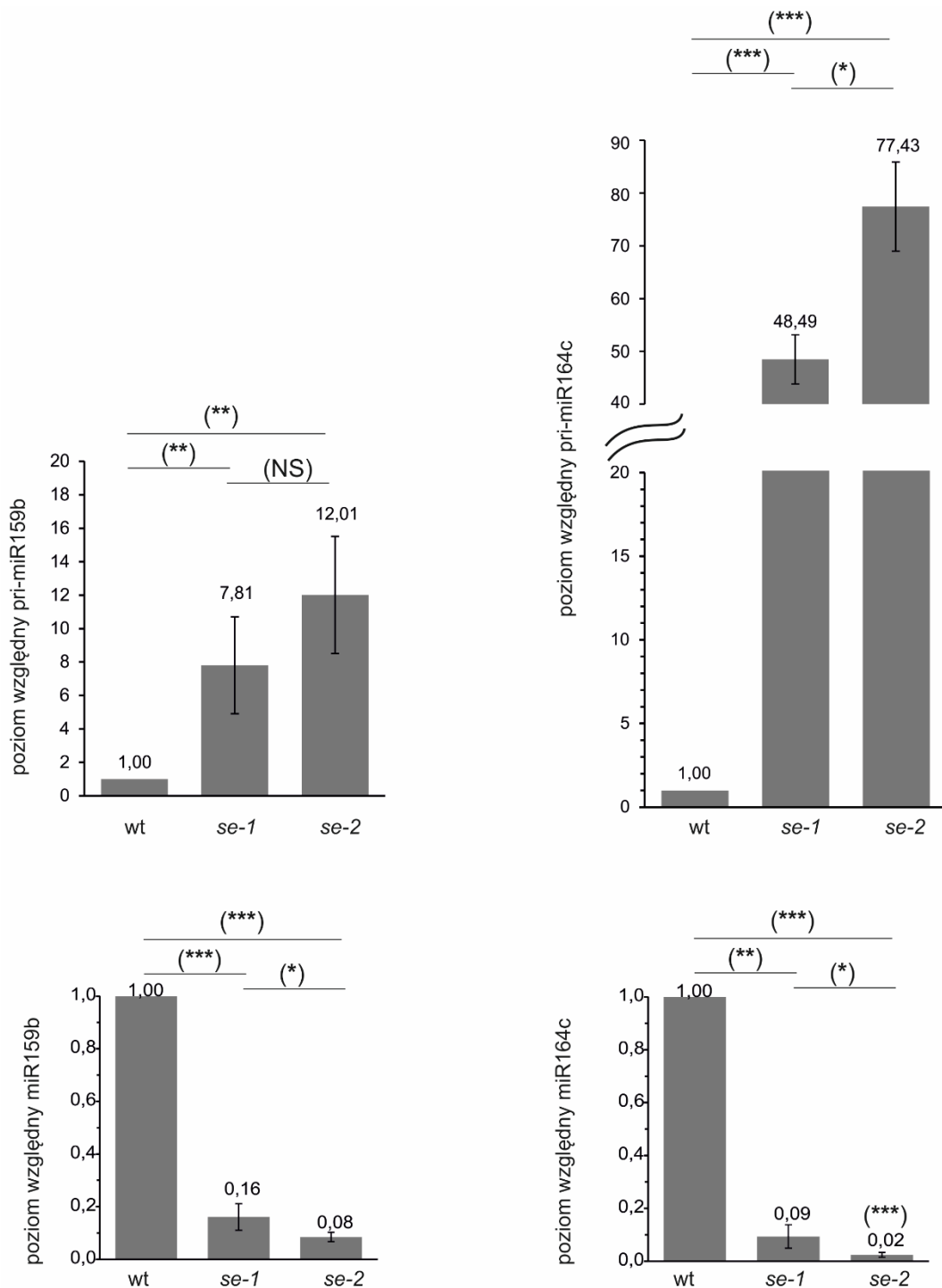


**Ryc. 47 Analiza oddziaływania między wariantami białka SERRATE, pozbawionymi 20 (SE $\Delta$ 702-720) lub 40 (SE $\Delta$ 681-720) aminokwasów z końca karboksylowego i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 lub AtCBP20 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach *Arabidopsis thaliana***

Donor - GFP w fuzji z wariantami SE (GFP- SE $\Delta$ 702-720; GFP- SE $\Delta$ 681-720); SE $\Delta$ 702-720 – wariant białka SE z usuniętymi aminokwasami 702-720 (odpowiada białku SE w mutancie *se-1*); SE $\Delta$ 681-720 – wariant białka SE z usuniętymi aminokwasami 681-720 (odpowiada białku SE w mutancie *se-2*); Akceptor - tRFP, tagRFP (tRFP) w fuzji z białkami AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b, AtLUC7rl lub AtCBP20; słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM, standard error of the mean;  $n > 10$ ); gwiazdki wskazują istotność statystyczną zmiany czasu trwania fluorescencji donora w obecności akceptora (\* $p < 0,001$ ).

W kolejnym etapie badano wpływ obecności (*se-1*) lub utraty (*se-2*) oddziaływań między SE i białkami snRNP U1 na biogenezę wybranych miRNA. W obydwóch analizowanych mutantach SE zaobserwowano już niższe poziomy miRNA i akumulację

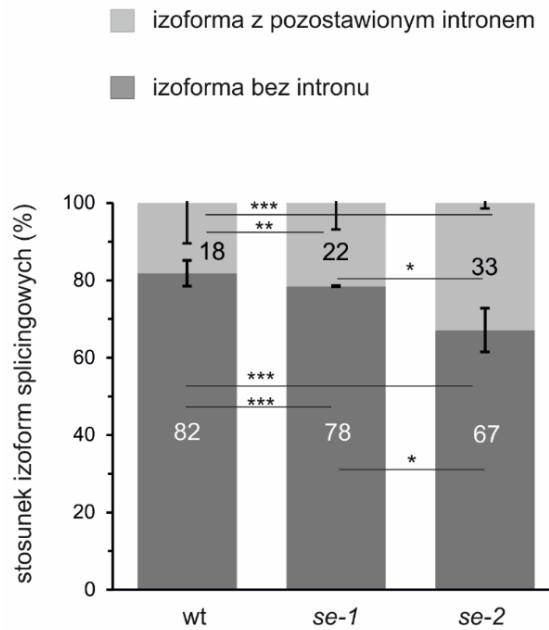
odpowiadających im prekursorów (Prigge i Wagner, 2001; Grigg i in., 2006; Zieleziński i in., 2015). Z tego powodu, w celu oceny zaburzeń podstawowej (niezależnej od splicingu) aktywności maszynerii biogenezy miRNA w *se-1* i *se-2*, w pierwszej kolejności badano poziom dwóch cząsteczek, produkowanych z genów pozbawionych intronów, tj. *MIR159b*, *MIR164c*. Poziom miRNA analizowano z wykorzystaniem specyficznych dla każdej cząsteczki fluorescencyjnie znakowanych sond (*TaqMan Probe*), natomiast ilość prekursora przy zastosowaniu PCR w czasie rzeczywistym oraz starterów komplementarnych do sekwencji spinki do włosów i miejsc ją otaczających. Zarówno w przypadku dojrzewania pri-miR159b jak i pri-miR164c, zaobserwowano akumulację prekursora oraz obniżony poziom miRNA w *se-1* względem roślin typu dzikiego (Ryc. 48). Do największego zahamowania dojrzewania prekursora doszło jednak w mutancie *se-2*, w którym poziom pri-miR159b i pri-miR164c był najwyższy. Wyniki te wskazują więc na to, że wraz z pogłębiającym się skróceniem SE od końca karboksylowego, obserwuje się coraz mniej efektywną podstawową (niezależną od splicingu pri-miRNA) biogenezę miRNA.



**Ryc. 48 Analiza dojrzewania pri-miR159b i pri-miR164c w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach se-1 i se-2**

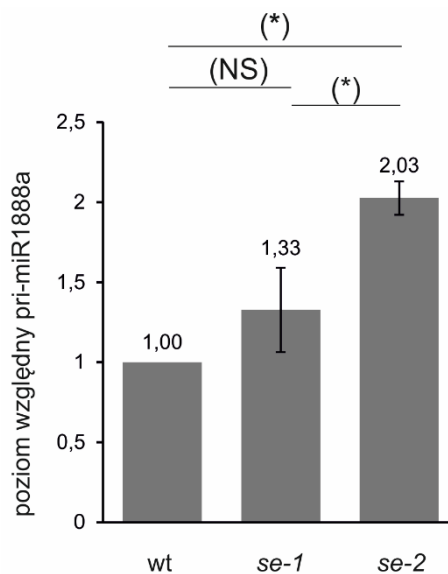
Górny panel przedstawia wynik analizy poziomu pri-miRNA podany w wartościach znormalizowanych do poziomu mRNA GAPDH, w odniesieniu do poziomu w wt; Dolny panel przedstawia wynik analizy poziomu miRNA podany w wartościach znormalizowanych do poziomu snRNA U6, w odniesieniu do poziomu w wt; Gwiazdką w nawiasie zaznaczono wynik analizy istotności różnic między próbą kontrolną i badaną. Analizę tą wykonano na wartościach znormalizowanych do poziomu mRNA GAPDH lub snRNA U6; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS – brak statycznie istotnych różnic.

W celu oceny roli oddziaływań między SE i białkami spliceosomu analizowano dojrzewanie prekursora, zawierającego intron. Z badań prowadzonych m.in. w Zakładzie Ekspresji Genów wynika, że oddziaływania te mogą mieć stymulującą rolę w przypadku dojrzewania tzw. egzonowych miRNA (struktura spinki do włosów znajduje się w egzonie pri-miRNA) i hamującą w trakcie biogenezy intronowych miRNA (zlokalizowanych w intronach mRNA lub innych niekodujących RNA) (Bielewicz i in., 2013, Knop i Stępień i in., 2016). Inaktywacja miejsca donorowego prowadzi do zahamowania splicingu w obydwóch przypadkach, ale kierunek zmian poziomu miRNA jest przeciwny. Obserwuje się zmniejszenie ilości egzonowych cząsteczek oraz podniesiony poziom intronowych miRNA. W niniejszej pracy sprawdzano więc, czy efekt braku oddziaływań między SE i snRNP U1 w mutancie *se-2* będzie tożsamy z efektem inaktywacji miejsca donorowego intronu zawierającego miRNA. W tym celu analizowano dojrzewanie prekursora miR1888a zlokalizowanego w pierwszym intronie *At5g21100*, kodującego oksydazę askorbinianową. Aktywność maszynerii splicingowej w pierwszym intronie *At5g21100* mierzono przy zastosowaniu PCR w czasie rzeczywistym, analizując stosunek ilości formy pozbawionej i z pozostawionym intronem. Statystycznie istotne zahamowanie wycinania intronu zawierającego miR1888a zaobserwowano zarówno w roślinach *se-1* i *se-2* (Ryc. 49). Największy udział formy z pozostawionym intronem odnotowano w drugim z wymienionych mutantów. Wynik ten korelował z rezultatem analizy dotyczącej poziomu prekursora miR1888a (pri-miR1888a), którą wykonano wykorzystując startery przyłączające się do sekwencji struktury spinki do włosów i intronu (Ryc. 50). Zaobserwowano akumulację pri-miR1888a w *se-2* w stosunku do roślin typu dzikiego i *se-1*. Analizy poziomu dojrzałego miR1888a wykazały natomiast obniżony jego poziom w *se-1* względem roślin typu dzikiego (Ryc. 51). W mutancie *se-2*, ilość tego krótkiego RNA była jednakże wyższa niż w *se-1*. Wskazuje to na stymulację biogenezy miR1888a w linii pozbawionej interakcji między SE i białkami snRNP U1 w stosunku do roślin *se-1*, w których obecne są jeszcze trzy z czterech oddziaływań między wspomnianymi elementami komórkowymi.



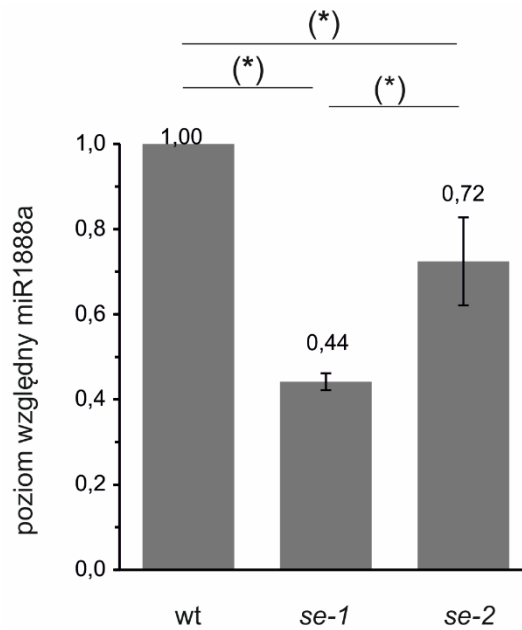
**Ryc. 49** Analiza stosunku izoform splicingowych pierwszego intronu *At5g21100*, zawierającego *miR1888a* w roślinach typu dzikiego (*wt*) oraz mutantach *se-1* i *se-2*

Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe ( $n=3$ ), a gwiazdki istotność statystyczną różnic w poziomie izoform splicingowych między *wt*, *se-1* i *se-2*; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,1$ , \*\*\* $p<0,001$ .



**Ryc. 50** Analiza poziomu *pri-miR1888a* w roślinach typu dzikiego (*wt*) oraz mutantach *se-1* i *se-2*

Wynik analizy podano w wartościach znormalizowanych do poziomu *mRNA GAPDH*, w odniesieniu do poziomu w *wt*. Gwiazdką w nawiasie zaznaczono wynik analizy istotności różnic między próbą kontrolną i badaną. Analizę tą wykonano na wartościach znormalizowanych do poziomu *mRNA GAPDH*; \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ , NS – brak statycznie istotnych różnic.



**Ryc. 51** Analiza poziomu miR1888a w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach *se-1* i *se-2*

Wynik analizy podano w wartościach znormalizowanych do poziomu snRNA U6, w odniesieniu do poziomu w wt. Gwiazdką w nawiasie zaznaczono wynik analizy istotności różnic między próbą kontrolną i badaną. Analizę tą wykonano na wartościach znormalizowanych do poziomu snRNA U6; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 6.1. Kompleks SERRATE/AtCBC

Roślinny kompleks wiążący czapeczkę (AtCBC, ang. *cap binding complex*), składający się z dwóch podjednostek, tj. AtCBP20 i AtCBP80, podobnie jak w komórkach ludzkich, zaangażowany jest w regulację splicingu konstytutywnego i alternatywnego (Kmieciak i in., 2002, Laubinger i in., 2008, Raczyńska i in., 2010, Lenasi i in., 2011). W procesach tych uczestniczy również roślinne białko SERRATE (SE) (Laubinger i in., 2008, Raczyńska i in., 2014). Rola AtCBC i SE polega głównie na regulacji wyboru alternatywnych miejsc donorowych w intronach znajdujących się na 5' końcu transkryptów. Ponadto, dowiedziono, że białka te zaangażowane są również w regulację biogenezy miRNA (Laubinger i in., 2008, Zieleziński i in., 2015). Wykazane w niniejszej pracy bezpośrednie oddziaływanie między SE i AtCBC wyjaśniły więc zbieżność wspomnianych funkcji, przez co pozwoliły na zrozumienie mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw zmian obserwowanych w roślinach *Arabidopsis thaliana*, w których uszkodzone są geny kodujące te białka.

W trakcie wykonywania eksperymentów do niniejszej rozprawy zaobserwowano silniejsze oddziaływanie SE z AtCBP20 niż z AtCBP80 (Ryc. 15). Co więcej, po inkubacji SE z obydwoma podjednostkami AtCBC jednocześnie, wykazano tworzenie potrójnego kompleksu AtCBC/SE oraz mocniejsze wiązanie analizowanych białek w porównaniu z indywidualnymi oddziaływaniami SE/AtCBP20 i SE/AtCBP80. Wyniki te częściowo wyjaśniają rezultaty uzyskane przez Zespół Xiaofeng Cao, które wskazują na istnienie bezpośredniego oddziaływania między SE i AtCBP20, ale również na jego brak w przypadku SE i AtCBP80 (Wang i in., 2013). Bardzo możliwe, że Zespół ten nie był w stanie wykryć słabszego oddziaływania między SE i większą podjednostką AtCBC. Ponadto, w analizach prowadzonych przy zastosowaniu tych samych technik co w niniejszej rozprawie, tj. BiFC i *pull down*, nie wykluczono, że wspomniany wynik negatywny nie jest skutkiem braku białka lub jego poprawnego zwinięcia w analizowanych próbach. Nie wyklucza się, że z podobnego powodu w niniejszej pracy obserwowano słabsze oddziaływanie SE z większą podjednostką, w porównaniu z wiązaniem SE/AtCBP20.

Obecność obydwóch elementów AtCBC w kompleksie z SE potwierdzono w Zakładzie Ekspresji Genów techniką immunoprecypitacji (Raczyńska i in., 2014). Wykorzystano w tym celu linię transgeniczną, w której powstaje białko fuzyjne FLAG-SE oraz przeciwciało rozpoznające etykietę FLAG. Podobny wynik uzyskano w trakcie eksperymentów prowadzonych w komórkach ludzkich. Ludzki homolog SE, tj. ARS2 (ARSENIC RESISTANCE PROTEIN 2), znajduje się w kompleksie zarówno z CBP20 jak i CBP80 (Gruber i in., 2009). Ponadto, ARS2 i CBC asocjują z tymi samymi RNA i białkami, co wskazuje na powiązanie ich funkcji w komórce. Ludzki homolog SE uznawany jest wręcz za element łączący CBC z wieloma innymi maszynieriami, zaangażowanymi w metabolizm RNA. Jedną z nich jest mikroprocesor, odpowiedzialny za pierwszy etap dojrzewania pri-miRNA, odbywający się na terenie jądra komórkowego. ARS2 oddziałuje z głównym białkiem tego kompleksu, tj. Drosha, przez co stymuluje efektywność i precyzję cięcia prekursora oraz podnosi jego stabilność (Gruber i in., 2009, O'Sullivan C i in., 2015). Taką samą rolę pełni ARS2 u *Drosophila*, gdzie także wykazano jego oddziaływanie z CBC i maszynierią zaangażowaną w biogenezę miRNA (Sabin i in., 2009). Co ciekawe, ARS2 oddziałuje w tym organizmie również z drugim ważnym enzymem dla dojrzewania krótkich RNA, tj. Dicer-2, którego aktywność obserwowana jest w cytoplazmie. Sugeruje się, że kompleks ARS2/Dicer-2 jest zaangażowany w cięcie długich dwuniciowych RNA do siRNA, będących elementem odpowiedzi na infekcje wirusowe.

Powyższe informacje wraz z wynikami opisanymi w niniejszej rozprawie wskazują na zakonserwowaną rolę SE w łączeniu CBC i mikroprocesora w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Regulacja biogenezy miRNA jest jednak tylko jedną z wielu funkcji, pełnionych przez kompleks CBC/ARS2 (CBCA). ARS2 w komórkach ludzkich pełni dodatkowo rolę łącznika między CBC i maszynieriami odpowiedzialnymi za dojrzewanie 3' końców transkryptów, eksport i naznaczanie RNA do degradacji (Gruber i in., 2009, Andersen i in., 2013, Hallais i in., 2013). Zaobserwowano, że w komórkach z wyciszoną ekspresją genów kodujących CBC i ARS2 dochodzi do powstawania wydłużonych transkryptów od strony 3' końca (Hallais i in., 2013). Obserwacja ta dotyczyła niepoprawnie zakończonych snRNA, mRNA kodujących histony zależne od cyklu komórkowego i RNA powstałych w wyniku aktywności polimerazy RNA II powyżej miejsca startu transkrypcji (PROMPTs, ang. *promoter upstream transcripts*). Co ciekawe, efekt ten nie był widoczny w przypadku transkryptów dłuższych niż tysiąc nukleotydów,

co sugeruje ograniczenie aktywności kompleksu CBCA pod względem dystansu od 5' końca transkryptu. Wyciszenie genów kodujących CBC i ARS2 prowadzi nie tylko do powstawania niepoprawnie zakończonych RNA, ale również większej ilości transkryptów PROMPT (Andersen i in., 2013). Uważa się, że białka te dzięki oddziaływaniu z elementami kompleksu NEXT (ang. *nuclear targeting complex*) uczestniczą w przekazywaniu transkryptów do jądrowego egzozomu, maszynierii odpowiedzialnej za degradację RNA. Ostatnie doniesienia wskazują na dodatkowe zaangażowanie w ten proces białka RBM7, które asocjuje z 3' końcami intronów pre-mRNA i razem z NEXT kieruje niepoprawnie wycięte z tych intronów snoRNA do degradacji (Lubas i in., 2013). Wyciszenie genów kodujących CBC i ARS2 prowadzi do zaburzonej asocjacji białka RBM7 z RNA, przez co sugeruje się, że kompleks CBCA jest odpowiedzialny za rekrutację NEXT do nowopowstałego transkryptu, przeznaczonego do degradacji (O'Sullivan i Howard, 2016). Mechanizm ten jest prawdopodobnie zakonserwowany, gdyż jego obecność odnotowano też w komórkach *Schizosaccharomyces pombe*. Drożdżowe ortologi ludzkiego CBC i ARS2 asocjują z kompleksem MTREC, odpowiedzialnym za kierowanie RNA z nieprawidłową poliadenylacją do usunięcia (Zhou i in., 2015).

Kolejne doniesienia wskazują na rolę CBC i ARS2 w eksporcie snRNA do cytoplazmy. Wykazano, że CBC wiąże się bezpośrednio z kompleksem odpowiedzialnym za ten proces, tj. PHAX (ang. *phosphorylated adapter for RNA export*) oraz, że ARS2 stymuluje to oddziaływanie (Andersen i in., 2013, Hallais i in., 2013). Dokładny mechanizm tej regulacji nie jest jednak dotychczas poznany. Sugeruje się również, że ze względu na możliwość wiązania czapeczki snoRNA przez kompleks CBCA oraz zaangażowanie PHAX w transport tych RNA do ciał Cajala, CBCA może uczestniczyć również w tym procesie (Boulon i in., 2004). CBC i ARS2 oddziałują również z elementami kompleksu TREX, odpowiedzialnego za eksport mRNA do cytoplazmy, przez co zwiększają wydajność tego procesu (Cheng i in., 2006, Dufu i in., 2010). Co ciekawe, udział CBCA w transporcie mRNA jest niezależny od splicingu, gdyż wykazano, że mechanizm ten dotyczy też bezintronowych RNA (Rodrigues i in., 2001, Nojima i in., 2007, Cheng i in., 2006, Lei i in., 2011).

Najnowsze doniesienia wskazują na redundancję mniejszej podjednostki ludzkiego CBC i nowo zidentyfikowanego trzeciego komponentu tego kompleksu, tj. NCBP3. Wykazano, że ostatnie wymienione białko może oddziaływać z CBP80 i czapeczką RNA w miejsce CBP20 (Gebhardt i in., 2015). Wymieniające się podjednostki CBC wykazały

jednak pewne preferencje do maszynerii zaangażowanych w eksport RNA – NCBP3 chętniej oddziałuje z TREX, a CBP20 z PHAX. Pomimo braku doniesień o trzecim białku CBP u *A. thaliana*, sytuacja taka mogłaby tłumaczyć, dlaczego u roślin, w przeciwieństwie do pełnej inaktywacji *SE*, podwójny mutant *cbc* jest ciągle żywotny (Prigge i Wagner, 2001, Raczyńska i in., 2010). Dotychczas nie opisano skutków całkowitego wyciszenia *CBP20* i *CBP80* w komórkach ludzkich, jednakże analogicznie z *A. thaliana*, uszkodzenie genu kodującego *ARS2* również ma charakter letalny (Wilson i in., 2008).

Wyżej przedstawione informacje świadczą o obszernej roli *ARS2* i *CBC* w metabolizmie RNA w komórkach zwierzęcych. U roślin dotychczas zaprzeczono udziałowi *CBC* w kontroli jakości RNA, odbywającej się na terenie cytoplazmy (Dzikiewicz-Krawczyk i in., 2008). Ze względu na brak u *A. thaliana* odrębnego mechanizmu dojrzewania 3' końców mRNA histonów regulowanych przez cykl komórkowy, kompleks *SE/AtCBC* jest pozbawiony również tej funkcji. *ARS2* uzyskał w tym celu dodatkowy fragment, nieobecny w *SE* (O'Sullivan i in., 2015). Jest nim motyw wiążący RNA (RRM), znajdujący się w domenie środkowej rdzenia *ARS2*. Mnogość procesów jaką regulują ludzkie odpowiedniki *SE* i *AtCBC* stanowią jednak podstawę do prowadzenia wielu interesujących badań dotyczących roli tych białek w komórce roślinnej. W Zakładzie Ekspresji Genów prowadzone są obecnie analizy, dotyczące zaangażowania *SE* w kierowanie produktów cięcia pri-miRNA do degradacji przez jądrowy egzosom. Proces ten bazuje prawdopodobnie na bezpośrednim oddziaływaniu między *SE* i elementami roślinnego kompleksu *NEXT*, tj. *AtZCCHC8* i *AtRBM7* (Bajczyk, dane niepublikowane). Wyniki te wskazują więc na to, że część funkcji *ARS2/CBC* jest zakonserwowana u roślin i zwierząt.

## 6.2. Kompleks *SERRATE/snRNP U1*

Pomimo znacznej ilości doniesień o powiązaniach *ARS2* z innymi białkami odpowiedzialnymi za dojrzewanie RNA, niedostępne są żadne dane o bezpośrednim wiązaniu tego białka z maszyną splicingową. Globalne analizy służące identyfikacji komponentów spliceosomu i białek z nim zasocjowanych ujawniły obecność *ARS2* przy pierwotnym transkrypcie RNA (Rappsilber i in., 2002, Zhou i in., 2002). Jednakże nie wyjaśniono do tej pory ewentualnej funkcji i mechanizmu molekularnego tej asocjacji. Wiadomo jednak, że *SE* wraz z *AtCBC* biorą udział w regulacji splicingu u roślin

(Laubinger i in., 2008, Raczyńska i in., 2010, 2014). Ponadto, wykazano obecność SE w skupiskach, zlokalizowanych na terenie nukleoplazmy, w których obecne są też białka bogate w argininę i serynę (SR), odpowiedzialne za regulację splicingu (Reddy, 2004, Fang i Spector, 2007). Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są pierwszym dowodem na bezpośredni kontakt SE ze spliceosomem.

W celu identyfikacji powiązania między maszyną biogenezy miRNA i splicingową, analizowano wszystkie specyficzne białka kompleksu snRNP U1 pod względem możliwości wiązania SE. Nie odnotowano oddziaływań z rdzeniowymi białkami budującymi ten kompleks, tj. AtU1A, AtU1C i AtU1-70K (Ryc. 16). Białka te zaangażowane są w utrzymywanie snRNA U1 w aktywnej konformacji oraz za stabilizację oddziaływania między tym niekodującym RNA i miejscem donorowym pierwotnego transkryptu (Heinrichs i in., 1990, Liao i in., 1992). Według doniesień literaturowych, elementami snRNP U1, odpowiedzialnymi za oddziaływanie z innymi komponentami spliceosomu i pozostałymi maszynami zaangażowanymi w metabolizm RNA, są białka pomocnicze tego kompleksu. Najwięcej doniesień dotyczy roli białek PRP40, które zapewniają bezpośredni kontakt z kompleksem snRNP U2, U5, ale również z maszyną poliadenylacją i kierującą mRNA do degradacji (Abovich i Rosbash, 1997, Colland i in., 2004, Sakashita i in., 2004, Ingham i in., 2005, Ester i Uetz, 2008, Becerra i in., 2015). Jak wykazano w niniejszej pracy, białka te oddziałują również z SE i wraz z AtPRP39b i AtLUC7r1 stanowią platformę dla kontaktu między mikroprocesorem i spliceosomem.

Wyniki niniejszej pracy dostarczają dodatkowych informacji dotyczących partnerów SE wśród elementów snRNP U1. Agregaty białkowe, które zaobserwowano po transfekcji protoplastów konstruktami kodującymi tRFP-AtPRP40a i tRFP-AtPRP40b na terenie cytoplazmy, mogą wskazywać na istotną rolę końca aminowego tych białek w ich transporcie do jądra komórkowego (Ryc. 19). Brak jest jednak jakichkolwiek doniesień dotyczących elementów odpowiedzialnych za transport PRP40 w innych organizmach. Ponadto, dzięki przeprowadzeniu analiz z wykorzystaniem markera ciał Cajala, wiadomo, że w przeciwieństwie do białek AtU1A, AtU1C i AtU1-70K, elementy pomocnicze kompleksu snRNP U1 nieobecne są w tych strukturach (Ryc. 20). Dokładna funkcja ciał Cajala nie jest zdefiniowana. Uważa się, że odbywa się w nich składanie lub recykling elementów splicingowych, dojrzewanie snRNA U3 oraz 3' końców histonowych mRNA (Shaw i in., 1993, Gall i in., 1995, Lamond i Earnshaw, 1998). Wyniki opublikowane w 2007 roku, sugerowały brak związku ciał Cajala z dojrzewaniem pri-miRNA u roślin.

Analizy wzajemnej lokalizacji HYL1 i koiliny nie wykazały nakładania się sygnałów, odpowiadających tym białkom (Fang i Spector, 2007). Ponadto, wykazano jednocześnie, że tworzenie przez HYL1 ziarnistości, nazywanych ciałami D (D-bodies) jest niezależne od struktur Cajala, gdyż w mutancie, w którym zaburzone jest powstawanie tych drugich elementów, widoczne są ciągle ciała D. Wyniki niniejszej pracy wykazały dodatkowo brak SE w miejscu występowania koiliny, stąd dodatkowo potwierdziły brak bezpośredniego powiązania między strukturami Cajala i maszyną biogenezy miRNA (Ryc. 20).

Kolejnym interesującym wynikiem, który dostarcza informacji na temat kompleksu snRNP U1 u *A. thaliana* jest identyfikacja aż czterech jego elementów, oddziałujących z SE (Ryc. 16, 17 i 20). W sytuacji, gdy do wszystkich tych interakcji dochodzi jednocześnie, ich mnogość może stabilizować komunikację między mikroprocesorem i spliceosomem. Wyniki te mogą jednak również świadczyć o zróżnicowaniu kompleksu snRNP U1 w komórce, w której w zależności od substratu i/lub warunków wzrostu białka pomocnicze się wymieniają. Na taki scenariusz wskazują wyniki analiz wzajemnej lokalizacji białek AtPRP40. Pomimo uzyskania wysokich współczynników Pearson'a i Manders'a w tych eksperymentach, ich wartości były niższe niż w przypadku pary AtPRP40b-AtPRP39b i AtPRP40b-AtLUC7rl (Ryc. 24 i 25). Może to więc sugerować istnienie struktur komórkowych, w których występuje tylko jedno z białek AtPRP40.

W przypadku SE, podobnie do AtPRP40, istotne było miejsce przyłączenia białka fluorescencyjnego. Dołączenie GFP do karboksylowego końca SE spowodowało utratę lokalizacji w specyficznych dla tego białka skupiskach, sugerując zaburzenia oddziaływań między SE a elementami obecnymi w tych strukturach (Fang i Spector, 2007) (Ryc. 18). Do podobnej sytuacji doszło po odcięciu całego aminowego nieustrukturyzowanego końca lub dwudziestu ostatnich aminokwasów z końca karboksylowego SE, kiedy również zaobserwowano homogenny sygnał jądrowy (Ryc. 28 i 44). Obecność białek snRNP U1, bez względu na brak (SE bez końca aminowego) lub zdolność SE (SE bez 20 aminokwasów, odpowiadające wersji białka w *se-1*) bezpośrednich z nimi oddziaływań, powodowała jednak przywrócenie charakterystycznych ziarnistości, w których znajdowały się również badane elementy snRNP U1 (Ryc. 29 i 45). Ponadto, zaobserwowano pełną ko-lokalizację między SE i białkiem AtPRP39a, które nie wykazało zdolności do bezpośredniego wiązania wspomnianego elementu mikroprocesora (Ryc. 16, 22 i 23). Wyniki te więc dowodzą również, że pełna ko-lokalizacja białek w komórce nie jest jednoznaczna z ich bezpośrednimi oddziaływaniami.

Wyniki analiz służących identyfikacji fragmentu SE, odpowiedzialnego za oddziaływania z białkami snRNP U1, pozwoliły zbadać ich rolę w biogenezie miRNA. Ze względu na to, że wykazano niezmiernie ważną funkcję nieustrukturyzowanych fragmentów SE w wiązaniu białek snRNP U1, w kolejnych analizach wykorzystywano dwie linie roślin, tj. *se-1* i *se-2*. W roślinach tych powstaje białko SERRATE skrócone o 20 (*se-1*) lub 40 (*se-2*) aminokwasów od końca karboksylowego (Prigge i Wagner, 2001) (Ryc. 41, 42 i 47). W drugim z wymienionych mutantów zaobserwowano również obniżenie poziomu transkryptu SE (Ryc. 43). Ze względu na niedostępność przeciwciała rozpoznającego krótsze formy SE, nie było jednak możliwe sprawdzenie ilości białka, jaka powstaje w tych roślinach. Wykazano w zamian, że wraz z coraz większym uszkodzeniem SE w *se-1* i *se-2*, spada wydajność dojrzewania bezintronowych pri-miRNA. Odnotowano bowiem w tych mutantach coraz wyższy poziom pierwotnych prekursorów i obniżającą się ilość dojrzałych miR159b i miR164c (Ryc. 48). Wyniki te sugerują więc, że w linii *se-2*, wydajność podstawowej biogenezy miRNA jest niższa niż w *se-1* i roślinach typu dzikiego.

W celu oceny roli oddziaływań SE-U1 w biogenezie miRNA, w niniejszej pracy analizowano dojrzewanie pri-miRNA, w przypadku którego wydajny splicing hamuje ten proces. Celem takiego podejścia było wyeliminowanie wpływu zaburzeń aktywności SE, niezwiązanej z oddziaływaniami z kompleksem snRNP U1, na poziom dojrzałej cząsteczki miRNA w analizowanych mutantach *se-1* i *se-2*. W 2008 roku zaproponowano, że miRNA zlokalizowane w intronach pre-mRNA (intronowe miRNA) mogą powstawać w rezultacie współpracy bądź kompetycji mikroprocesora i spliceosomu (Brown i in., 2008). W przypadku biogenezy miR1888a, znajdującego się w pierwszym intronie transkryptu kodującego oksydazę askorbinianową, aktywny kompleks SE/U1 ma negatywny wpływ na dojrzewanie prekursora w 14-dniowej siewce *A. thaliana* (Knop i Stępień i in., 2016). Zaobserwowano bowiem mniej wydajny splicing intronu, zawierającego miR1888a i podniesiony poziom dojrzałej cząsteczki w *se-2*, w porównaniu z roślinami *se-1*, w których do części oddziaływań SE-U1 jeszcze dochodzi. W niniejszej pracy wykazano, że brak kontaktu SE z U1 w 35-dniowych roślinach linii *se-2*, zgodnie z obserwacjami w młodszych roślinach, wpłynął na zahamowanie splicingu intronu zawierającego miR1888a i stymulację powstawania dojrzałej cząsteczki w porównaniu do mutantu *se-1* (Ryc. 47 i 51). Potwierdziło to tym samym niezależność wspomnianej regulacji od stadium rozwojowego *A. thaliana*.

Taki sam mechanizm zaobserwowano w trakcie analiz nad powstawaniem innego intronowego miRNA, tj. miR402 (Knop i Stępień i in., 2016). W tym przypadku również zaobserwowano obniżony poziom dojrzałej cząsteczki w *se-1* w porównaniu z roślinami typu dzikiego i częściowe przywrócenie wydajności biogenezy w *se-2*. Nie można jednak wykluczyć zaburzenia wiązania SE z innym partnerem lub ilości białka w komórce wskutek utraty 20 aminokwasów, różniących wersję SE w *se-1* i *se-2*. Zgodnie z danymi literaturowymi i niniejszej pracy, fragment ten nie jest zaangażowany w bezpośrednie oddziaływanie z DCL1, HYL1 oraz AtCBC (Machida i in., 2011) (Ryc. 15). Ponadto, w obydwóch mutantach SE, bez względu na poziom mRNA SE, zaobserwowano stopniowy spadek wydajności wycinania intronów, który może odzwierciedlać stopniową utratę partnerów snRNP U1, przez co destabilizację połączenia między mikroprocesorem i spliceosomem (Knop i Stępień i in., 2016) (Ryc. 47 i 49).

Zidentyfikowane oddziaływanie między SE i snRNP U1 może również tłumaczyć stymulującą rolę splicingu w dojrzewaniu prekursorów, w których miRNA znajduje się w egzonie poprzedzającym analizowany intron. Inaktywacja miejsca donorowego prekursorów miR163, miR161 i miR172b prowadziła do obniżenia poziomu dojrzałych cząsteczek (Bielewicz i in., 2013, Schwab i in., 2013). Utrata snRNP U1 związana z mutacją miejsca splicingowego powodowała zahamowanie wycinania intronów z analizowanych transkryptów. Wynik ten koreluje z zaburzeniami splicingu pri-miR163 oraz coraz niższym poziomem dojrzałego miRNA, zaobserwowanym w liniach *se-1* i *se-2* (Knop i Stępień i in., 2016). Z tego powodu sugeruje się, że stymulująca rola procesu wycinania intronów z pri-miRNA w biogenezie egzonowych miRNA bazuje w dużym stopniu na oddziaływaniu między SE i snRNP U1.

Powyższe wyniki wskazują na odmienną rolę oddziaływania SE-U1 w zależności od lokalizacji struktury spinki do włosów względem 5' końca transkryptu i miejsca donorowego intronu. Rezultaty eksperymentów prowadzonych w Zakładzie Ekspresji Genów UAM wskazują bezpośrednio na różną rolę kompleksu snRNP U1 w przypadku biogenezy intronowych i egzonowych miRNA. W trakcie badań nad mechanizmem odpowiedzialnym za powstawanie intronowego miR402, sekwencję kodującą strukturę spinki do włosów, zlokalizowaną pierwotnie w pierwszym intronie, przeniesiono do poprzedzającego go egzonu (Knop i Stępień i in., 2016). W ten sposób uzyskano gen kodujący egzonową cząsteczkę miR402. Następnie porównywano efekt inaktywacji miejsca donorowego transkryptów z pre-miRNA zlokalizowanym w egzonie lub intronie

pierwotnego prekursora, na wydajność biogenezy miRNA. W wyniku inaktywacji miejsca splicingowego 5' w przypadku obecności struktury spinki do włosów w intronie, odnotowano podniesiony poziom miR402, natomiast w przypadku egzonowego miRNA – obniżoną ilość analizowanej cząsteczki. Ze względu na lokalizację struktury spinki do włosów, oddziaływania między SE i snRNP U1 mogą więc stymulować lub osłabiać aktywność mikroprocesora.

### **6.3. SERRATE, platformą dla oddziaływań białek zaangażowanych w biogenezę miRNA**

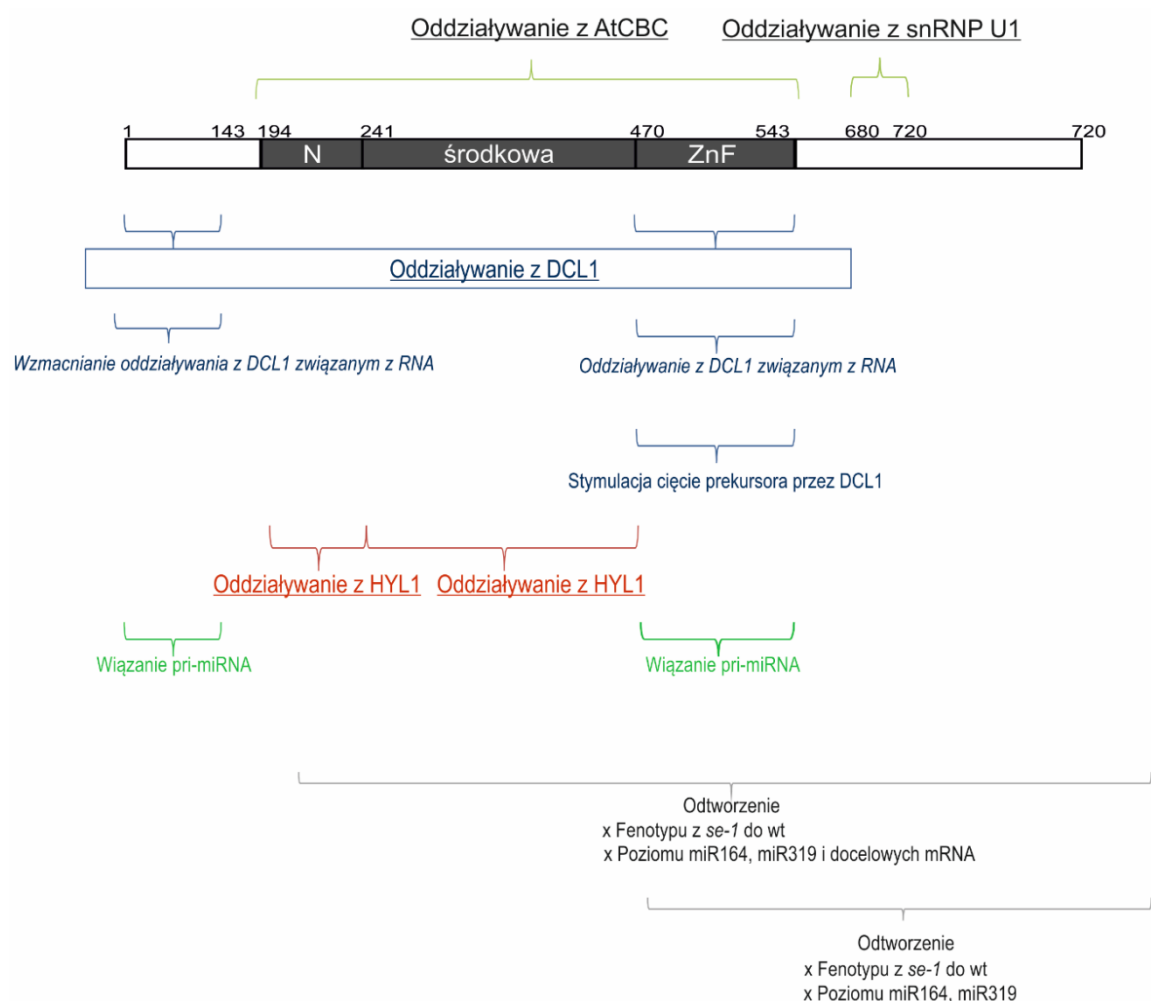
W 2011 roku, w pracy opisującej strukturę SE, przedstawiono, że ustrukturyzowany centralny rdzeń białka odpowiedzialny jest za oddziaływanie z drugim pomocniczym białkiem DCL1, tj. HYL1 (Machida i in., 2011). Wykazano, że do jego związania wystarczy jedna z dwóch domen rdzenia SE, tj. domena aminowa lub środkowa. Wyniki niniejszej rozprawy wykazały zaangażowanie ustrukturyzowanej części SE w oddziaływanie z AtCBC. Wskazują na to rezultaty eksperymentów typu *pull down* jak również FRET-FLIM, potwierdzając tym samym to oddziaływanie w warunkach *in vitro* i *in vivo* (Ryc. 15, 32 i 36). Jest to sprzeczne z przypuszczeniami zespołu Yuana, który w 2013 roku sugerował, iż w wiązanie AtCBC zaangażowany jest karboksylowy koniec SE (Iwata i in., 2013). Sugestie te zostały zbudowane na bazie obserwacji fenotypu i niesprawności biogenezy miRNA oraz splicingu w liniach *cbc* i *se-1*. Ze względu na wysokie podobieństwo we wszystkich tych zakresach, wysunięto hipotezę, że efekty te są wynikiem zaburzeń oddziaływań między SE i AtCBC we wspomnianych mutantach, a szczególnie w *se-1*, w którym uszkodzony jest koniec karboksylowy SE. Hipoteza ta byłaby zgodna z wynikami prac nad ludzkimi odpowiednikami tych białek. Wykazano bowiem, że w oddziaływanie z CBC zaangażowany jest nieustrukturyzowany karboksylowy fragment ARS2 (Hallais i in., 2013, O'Sullivan C i in., 2015). W świetle wyników niniejszej pracy można zaproponować alternatywną hipotezę. Efekty mutacji w liniach *se-1* i *cbc* mogą być wynikiem uszkodzenia procesu, w którym obydwa te białka uczestniczą. Nie wiadomo jednak nadal, jaka jest molekularna rola ostatnich dwudziestu aminokwasów SE w komórce roślinnej. Pełnią one z pewnością bardzo istotną ewolucyjnie funkcję ze względu na wysokie zakonserwowanie ich sekwencji wśród roślin, w tym rzodkiewnika, winorośli, kukurydzy, sorgo i ryżu (Iwata i in., 2013). Wyniki niniejszej rozprawy sugerują ich zaangażowanie w oddziaływanie z AtPRP39b i stymulację splicingu

prekursorów miRNA, gdyż w mutancie *se-1* zaobserwowano już częściowe zahamowanie wydajności wycinania intronu, zawierającego miR1888a (Ryc. 49) (Knop i Stępień i in., 2016). W celu sprawdzenia tej hipotezy wymagane jest jednak przeprowadzenie dodatkowych eksperymentów.

Ze względu na zaangażowanie ustrukturyzowanego rdzenia SE w oddziaływanie z AtCBC i HYL1 nie wiadomo również czy interakcje te zachodzą jednocześnie, czy po rekrutacji SE przez AtCBC do transkryptu, miejsce AtCBC zajmuje HYL1. W celu odpowiedzi na te pytania, należałoby lepiej scharakteryzować miejsce wiązania tych białek oraz przeprowadzić testy kompetycji wiązania AtCBC i HYL1 do SE.

Wymagania strukturalne SE do związania DCL1 różnią się nieznacznie w zależności od asocjacji RNA z endorybonukleazą (Iwata i in., 2013). W sytuacji braku RNA w kompleksie z DCL1, wymagana jest obecność palca cynkowego SE i jego nieustrukturyzowanego aminowego fragmentu. W przypadku związania RNA przez DCL1, sugeruje się, że zdarzenie to wymusza zmianę konformacji DCL1, co następnie umożliwia zajście interakcji między endorybonukleazą i palcem cynkowym SE. Wiązanie to jest krytyczne dla stymulującej roli SE w cięciu prekursora przez DCL1. Zespół, który opublikował te dane postuluje, że pomimo związania DCL1 z RNA, domena katalityczna tego białka jest ciągle nieaktywna. Związanie palca cynkowego SE blisko miejsca aktywnego DCL1 miałyby spowodować zmianę ułożenia dwóch domen RNazy III względem siebie i stymulować utworzenie poprawnie zorientowanego miejsca aktywnego. Roli wiązania RNA przez nieustrukturyzowany aminowy koniec i palec cynkowy SE w tym mechanizmie jak dotychczas jednak nie wyjaśniono (Machida i in., 2011, Iwata i in., 2013). Zaangażowanie poszczególnych fragmentów SE w oddziaływanie z podstawowymi elementami biogenezy miRNA podsumowano na schemacie przedstawionym na Rycinie 52.

Wiązanie ludzkiego odpowiednika SE do głównego białka mikroprocesora i RNA przebiega natomiast inaczej. Podczas gdy, w oddziaływanie z Drosha zaangażowana jest środkowa domena rdzenia, palec cynkowy odpowiedzialny jest za wiązanie RNA (O'Sullivan C i in., 2015).



**Ryc. 52 Schemat zaangażowania poszczególnych fragmentów białka *SERRATE* w oddziaływania z podstawowymi elementami biogenezy miRNA i snRNP U1**

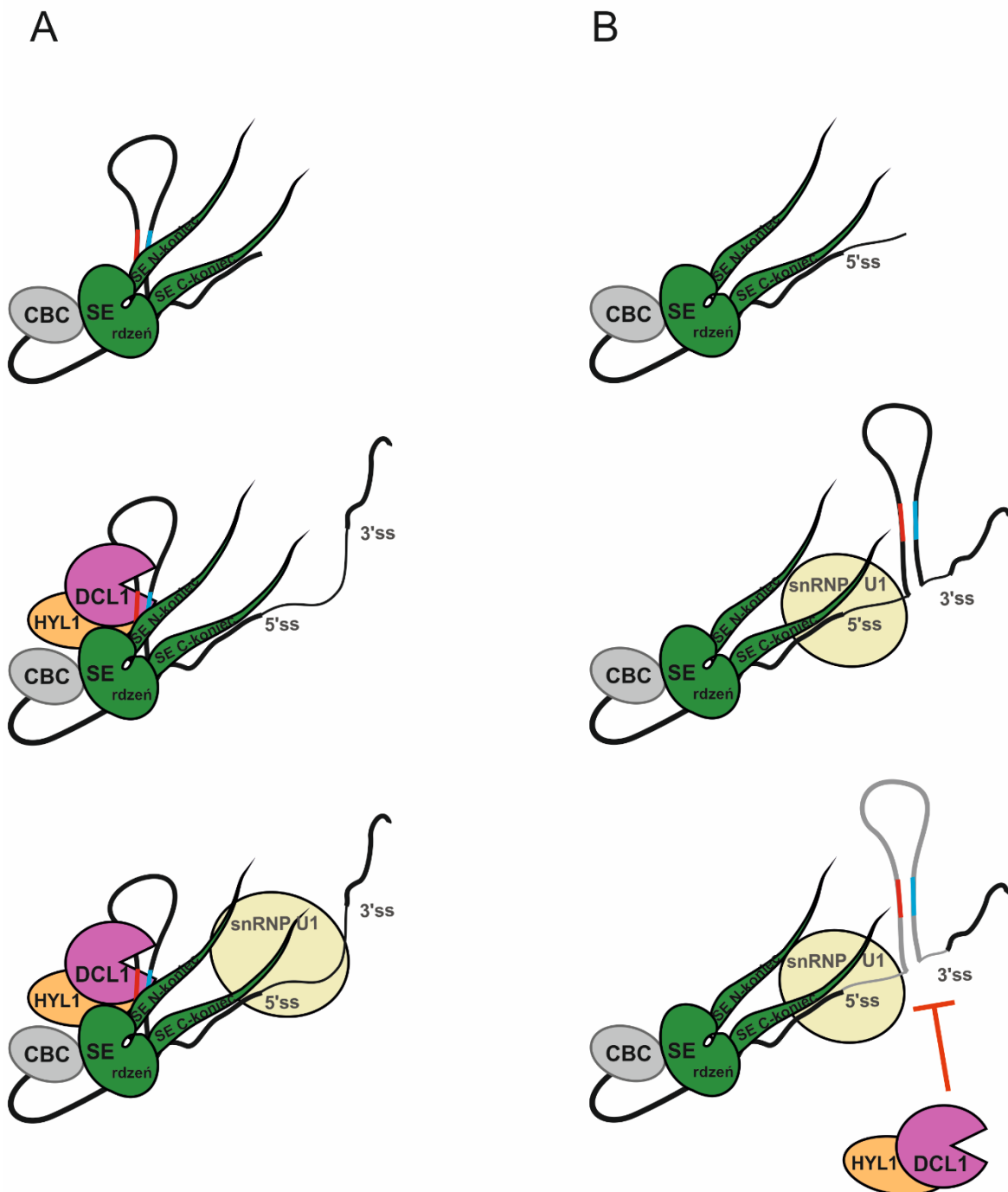
Budowę *SERRATE* przedstawiono schematycznie z podziałem na nieustrukturyzowane fragmenty (białe prostokąty) i ustrukturyzowany rdzeń (szare prostokąty), składający się z N - domeny aminowej, domeny środkowej i ZnF - palca cynkowego; liczby wskazują poszczególne aminokwasy; *DCL1* – *DICER-LIKE 1* (endorybonukleaza typu III); *HYL1* – *HYPONASTIC LEAVES 1*; *AtCBC* – kompleks wiążący czapeczkę; *wt* – rośliny typu dzikiego; *se-1* – linia *Arabidopsis thaliana* z uszkodzonym *SE*.

Wyniki niniejszej pracy, poza identyfikacją partnerów *SE* wśród snRNP U1, dowodzą istotnej roli jego nieustrukturyzowanych końców w tych oddziaływaniach (Ryc. 32, 36 i 52). Były one wystarczające do związania AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7r1, a kluczowym elementem *SE* okazało się być dwadzieścia aminokwasów na końcu karboksylowym białka (reszty 681-700) (Ryc. 47). Czwarte białko, tj. AtPRP39b, potrzebuje prawdopodobnie dodatkowych elementów rdzenia *SE* lub innych elementów snRNP U1. Zaangażowanie nieustrukturyzowanych fragmentów *SE* w oddziaływania

z białkami spliceosomu pozwala jednak na kontakt z kompleksem snRNP U1, niezależnie od wiązania głównych białek mikroprocesora, w które uwikłany jest rdzeń SE.

Nieustrukturyzowane końce SE są nie tylko odpowiedzialne za oddziaływanie z elementami snRNP U1, ale także za transport SE do jądra. Po transfekcji protoplastów konstruktem kodującym centralny ustrukturyzowany rdzeń SE, zaobserwowano bowiem, oprócz sygnału jądrowego, jego obecność również na terenie cytoplazmy (Ryc. 39). Taką lokalizacją nie charakteryzowało się natomiast białko składające się z samych nieustrukturyzowanych końców SE, rozdzielonych GFP (Ryc. 34).

Na podstawie doniesień literaturowych jak również wyników niniejszej pracy można więc zaproponować model przedstawiający mechanizm przyłączania się do pri-miRNA białek odpowiedzialnych za biogenezę miRNA. W pierwszej kolejności z czapczką nowopowstałego transkryptu wiąże się AtCBC, z którym oddziałuje SE (Ryc. 53). Następnie w przypadku prekursorów, w których pre-miRNA znajduje się między 5' końcem transkryptu i miejscem donorowym intronu (egzonowe miRNA), do SE dołącza DCL1 i HYL1 (Ryc. 53A). W trakcie dalszej syntezy pri-miRNA, z miejscem donorowym intronu (zlokalizowanym poniżej pre-miRNA) wiąże się snRNP U1, który dzięki oddziaływaniu z SE stymuluje pracę maszyny wycinającej miRNA. W sytuacji, gdy pre-miRNA znajduje się w intronie, przyłączenie snRNP U1 do miejsca donorowego powoduje efektywne wycinanie intronu, w czym uczestniczy również AtCBC i SE (Ryc. 53B). Funkcja AtCBC i SE jest więc prawdopodobnie ograniczona do stymulacji splicingu, stąd wycinanie prekursora przez DCL1 jest mniej efektywne, co skutkuje niskim poziomem miRNA. Tylko w sytuacji zaburzenia splicingu i/lub oddziaływań SE-snRNP U1, biogeneza miRNA z intronu będzie wydajniejsza. Wynik taki zaobserwowano w warunkach stresu abiotycznego, takich jak susza i zasolenie. Poziom cząsteczki miR402, jak również innego intronowego miRNA, tj. miR162a, podnosił się po traktowaniu *A. thaliana* wspomnianymi warunkami stresowymi, czemu towarzyszyło zahamowanie wycinania intronów, z których te cząsteczki powstają (Knop i Stępień i in., 2016, Barciszewska-Pacak i in., 2016).



**Ryc. 53** Model przedstawiający możliwą kolejność przyłączania się do pri-miRNA podstawowych białek zaangażowanych w biogenezę egzonowych (A) i intronowych (B) miRNA

DCL1 – DICER-LIKE 1 (endorybonukleaza typu III); HYL1 – HYPONASTIC LEAVES 1; SE – SERRATE; CBC – kompleks wiążący czapeczkę; 5'ss – miejsce donorowe; 3'ss – miejsce akceptorowe intronu.

Wszystkie opisane wyżej wyniki wskazują na to, że SE jest niezwykle istotnym białkiem odpowiedzialnym za kontakt między mikroprocesorem i spliceosomem.

Co więcej, jego oddziaływanie z kompleksem snRNP U1 modulują wydajność dojrzewania prekursorów miRNA, w zależności od usytuowania struktury spinki do włosów względem 5' końca transkryptu i miejsca donorowego intronu, znajdującego się w prekursorze. Poza wspomnianymi elementami komórkowymi zaangażowanymi w biogenezę miRNA, SE oddziałuje również z wieloma innymi białkami, których wpływ na dojrzewanie niekodujących RNA jest już również udokumentowany (Tabela 3). Nie wiadomo jednak, z którymi fragmentami SE oddziałuje ta liczna grupa białek, jak silne jest to wiązanie i jaki jest mechanizm ich aktywności. Badania mające na celu rozwiązać te problemy badawcze byłyby niezwykle interesujące, szczególnie ze względu na dynamikę tworzenia się różnych kompleksów SE. Tylko takie podejście badawcze pozwoli w przyszłości zrozumieć działanie maszynery biogenezy tych niezwykle istotnych cząsteczek, jakimi są miRNA.

Tabela 3 Zestawienie białek, zaangażowanych w biogenezę miRNA, oddziałujących z SERRATE (SE)

<b>Białko</b>	<b>Domeny odpowiedzialne za oddziaływania</b>	<b>Metoda, która posłużyła do identyfikacji oddziaływania</b>	<b>Referencje</b>
<b>DCL1</b>	SE – nieustrukturyzowany fragment aminowy i palec cynkowy; DCL1 – domena PAZ i helikazy	BiFC, <i>pull down in vitro</i>	Fang i Spector, 2007, Machida i in., 2011, Iwata i in., 2013
<b>HYL1</b>	dsRBD2	YTH, IP, <i>pull down in vitro</i> , BiFC	Yang i in., 2006 Fang i Spector, 2007 Machida i in., 2011
<b>SE</b>	brak danych	BiFC	Fang i Spector, 2007, Wang i in., 2013
<b>AtCBP20</b>	SE – ustrukturyzowany rdzeń; AtCBP20 – brak danych	BiFC, <i>pull down in vitro</i>	niniejsza praca (Raczyńska i in., 2014) Wang i in., 2013
<b>AtCBP80</b>	SE – ustrukturyzowany rdzeń; AtCBP80 – brak danych	BiFC, <i>pull down in vitro</i>	niniejsza praca (Raczyńska i in., 2014) Wang i in., 2013
<b>TOUGH</b>	brak danych	<i>pull down</i> , BiFC	Ren i in., 2012
<b>HOS5</b>	brak danych	BiFC	Chen i in., 2015
<b>RS41</b>	brak danych	BiFC	Chen i in., 2015
<b>RS40</b>	brak danych	BiFC	Chen i in., 2015
<b>AtRACK1</b>	brak danych	YTH, IP, BiFC	Speth i in., 2013
<b>AtPRL1</b>	brak danych	BiFC, IP	Zhang i in., 2014
<b>AtCDC5</b>	brak danych	BiFC, IP	Zhang i in., 2013 Zhang i in., 2014
<b>CPL1</b>	brak danych	IP, BiFC, YTH	Manavella i in., 2012
<b>AtNOT2b</b>	brak danych	BiFC, YTH, <i>pull down in vitro</i>	Wang i in., 2013
<b>AtELP2</b>	brak danych	BiFC, YTH	Fang i in., 2015
<b>AtELP5</b>	brak danych	BiFC, YTH	Fang i in., 2015

<b>AtPRP39b</b>	SE – nieustrukturyzowane końce + niezidentyfikowany fragment rdzenia; AtPRP39b – brak danych	YTH, <i>pull down in vitro</i> , FRET- FLIM	niniejsza praca (Knop i Stępień i in., 2016)
<b>AtPRP40a</b>	SE – nieustrukturyzowane końce; AtPRP40a – brak danych	YTH, <i>pull down in vitro</i> , FRET- FLIM	niniejsza praca (Knop i Stępień i in., 2016)
<b>AtPRP40b</b>	SE – nieustrukturyzowane końce; AtPRP40b – brak danych	YTH, <i>pull down in vitro</i> , FRET- FLIM	niniejsza praca (Knop i Stępień i in., 2016)
<b>AtLUC7rl</b>	SE – nieustrukturyzowane końce; AtLUC7rl – brak danych	YTH, <i>pull down in vitro</i> , FRET- FLIM	niniejsza praca (Knop i Stępień i in., 2016)

*BiFC* – ang. *Bimolecular Fluorescence Complementation*; *YTH* – dwuhybrydowy system drożdżowy (ang. *yeast two-hybrid system*); *IP* – immunoprecypitacja kompleksów białkowych; *FRET-FLIM* - ang. *Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging*; *DCL1* – *DICER-LIKE 1* (endorybonukleaza typu III); *HYL1* – *HYPONASTIC LEAVES 1*; *SE* – *SERRATE*; *CBP* – białko wiążące czapeczkę; *RS* – białko bogate w argininę i serynę; *RACK1* – *RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1*; *PRL1* – *PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1*; *CDC5* – *CELL DIVISION CYCLE*; *CPL1* – *C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE LIKE 1*; *NOT2* – *NEGATIVE ON TATA LESS 2*; *ELP* – *ELONGATOR PROTEIN*; *PRP* – *pre-mRNA PROCESSING PROTEIN*

1. SERRATE (SE) oddziałuje bezpośrednio z obydwoma podjednostkami jądrowego kompleksu wiążącego czapeczkę (AtCBC), tj. AtCBP20 i AtCBP80. Za oddziaływanie te odpowiedzialny jest ustrukturyzowany rdzeń SE.
2. Identyfikacja kompleksu SE/AtCBC pozwoliła przybliżyć zrozumienie mechanizmu odpowiedzialnego za podwójną rolę SE i AtCBC w biogenezie miRNA i splicingu pre-mRNA.
3. SE oddziałuje bezpośrednio z czterema białkami pomocniczymi kompleksu snRNP U1, tj. AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl. Nieustrukturyzowany koniec aminowy i karboksylowy SE jest zaangażowany w te interakcje. Elementem SE koniecznym dla związania AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl są reszty aminokwasowe 681-700.
4. Oddziaływania między SE i AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b oraz AtLUC7rl stanowią platformę dla kontaktu między maszyną biogenezy miRNA i spliceosomem. Modułują one wydajność dojrzewania prekursorów miRNA w zależności od usytuowania struktury spinki do włosów względem 5' końca transkryptu i miejsca donorowego intronu, znajdującego się w prekursorze.
5. Nieobecność SE i pomocniczych białek snRNP U1 w ciałach Cajala potwierdza brak bezpośredniego powiązania między tymi strukturami i dojrzewaniem prekursorów miRNA.
6. Na podstawie wyników niniejszej pracy i danych literaturowych zaproponowano model przedstawiający mechanizm przyłączania się do pri-miRNA białek odpowiedzialnych za biogenezę miRNA. W modelu tym SE jest istotnym elementem odpowiedzialnym za kontakt między AtCBC, mikroprocesorem i spliceosomem.
7. Ze względu na dużą liczbę dodatkowych białek zaangażowanych w biogenezę miRNA, z których wiele oddziałuje z SE, w celu pełniejszego zrozumienia biogenezy miRNA, niezwykle istotne jest przeprowadzenie analiz dotyczących dynamiki i lokalizacji w komórce kompleksów białkowych odpowiedzialnych za ten proces.

## WYKAZ RYCIN I TABEL

Ryc. 1 Schemat przedstawiający struktury klas genów kodujących miRNA u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
Ryc. 2 Uproszczony schemat biogenezy i funkcjonowania miRNA w komórce roślinnej. 16	
Ryc. 3 Schemat biogenezy miRNA u roślin z zaznaczeniem białek pomocniczych, zaangażowanych w ten proces.....	21
Ryc. 4 Schemat przedstawiający proponowaną rolę kompleksu snRNP U1 w biogenezie miRNA (stymulacja) i w ochronie transkryptów przed przedwczesną poliadenylacją.....	24
Ryc. 5 Schemat reakcji splicingu pre-mRNA .....	27
Ryc. 6 Schemat budowania konstytutywnego spliceosomu w trakcie reakcji splicingu pre-mRNA.....	29
Ryc. 7 Lokalizacja białek podstawowych kompleksu snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
Ryc. 8 Wzajemna lokalizacja białek AtU1-70K i AtSRp34 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
Ryc. 9 Analiza oddziaływań między SERRATE (SE) i podjednostkami AtCBC (AtCBP20, AtCBP80) w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> przy zastosowaniu techniki BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation).....	68
Ryc. 10 Szczegółowa analiza oddziaływań między SERRATE (SE) i AtCBP20 (podjednostką AtCBC) w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> przy zastosowaniu techniki BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) .....	68
Ryc. 11 Nadekspresja wariantów białka SERRATE (SE) w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w <i>Escherichia coli</i> , prowadzona w 20°C przez 16 godzin.....	69
Ryc. 12 Nadekspresja dwóch wariantów białka SERRATE (SE) w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w <i>Escherichia coli</i> , prowadzona w 37 °C .....	70
Ryc. 13 Nadekspresja ustrukturyzowanego fragmentu białka SE, tj. SE <sub>194-543</sub> , w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w <i>Escherichia coli</i> , prowadzona w 37°C .....	71
Ryc. 14 Nadekspresja białka GFP w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP) w <i>Escherichia coli</i> .....	72
Ryc. 15 Analiza oddziaływań między SERRATE (SE) i podjednostkami AtCBC (AtCBP20, AtCBP80) przy zastosowaniu techniki pull down.....	73
Ryc. 16 Identyfikacja białek kompleksu snRNP U1 oddziałujących z SERRATE (SE) przy pomocy dwyhdydowego systemu drożdżowego.....	76
Ryc. 17 Analiza oddziaływania między SERRATE (SE) i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 przy zastosowaniu techniki pull down .....	77

Ryc. 18 Analiza lokalizacji SERRATE (SE), powstającego w fuzji z białkiem fluorescencyjnym GFP, przyłączonym na karboksylowym lub aminowym końcu SE w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	78
Ryc. 19 Analiza lokalizacji AtPRP40a i AtPRP40b, powstających w fuzji z białkiem fluorescencyjnym tagRFP (tRFP), przyłączonym do ich aminowych końców w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	78
Ryc. 20 Analiza wzajemnej lokalizacji wybranych białek wchodzących w skład snRNP U1 i SE z markerem ciał Cajala – Koiliną w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	80
Ryc. 21 Analiza wzajemnej lokalizacji SERRATE (SE) i wybranych białek wchodzących w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	81
Ryc. 22 Analiza oddziaływania między SERRATE (SE) i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	82
Ryc. 23 Analiza wzajemnej lokalizacji SERRATE (SE) i AtPRP39a w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	83
Ryc. 24 Analiza wzajemnej lokalizacji AtPRP40a i AtPRP40b w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	84
Ryc. 25 Analiza wzajemnej lokalizacji AtPRP39b oraz AtLUC7rl z AtPRP40b w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	84
Ryc. 26 Schemat wariantów białka SERRATE (SE) wykorzystywanych w analizach służących identyfikacji fragmentu odpowiedzialnego za oddziaływanie z partnerami białkowymi w kompleksie snRNP U1 .....	85
Ryc. 27 Analiza oddziaływania między białkiem SERRATE (SE) w trzech wariantach: pełnej długości, wariantem pozbawionym końca aminowego (SE $\Delta$ N) lub karboksylowego (SE $\Delta$ C) i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 przy zastosowaniu dwuhybrydowego systemu drożdżowego .....	86
Ryc. 28 Analiza lokalizacji wariantów białka SERRATE (SE), pozbawionych końca aminowego (SE $\Delta$ N) lub karboksylowego (SE $\Delta$ C) w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87
Ryc. 29 Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka SERRATE, pozbawionego końca aminowego (SE $\Delta$ N) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	88
Ryc. 30 Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka SERRATE, pozbawionego końca karboksylowego (SE $\Delta$ C) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	89
Ryc. 31 Analiza wzajemnej lokalizacji wariantów białka SERRATE, pozbawionych końca aminowego (SE $\Delta$ N) lub karboksylowego (SE $\Delta$ C) z AtPRP39a i AtCBP20 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	91

Ryc. 32 Analiza oddziaływania między wariantami białka SERRATE, pozbawionymi końca aminowego (SE $\Delta$ N) lub karboksylowego (SE $\Delta$ C) i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 lub AtCBP20 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	92
Ryc. 33 Schemat wariantu białka SERRATE (SE) wykorzystywanego w analizach służących ocenie roli ustrukturyzowanego rdzenia w oddziaływaniu z partnerami białkowymi w kompleksie snRNP U1 .....	92
Ryc. 34 Analiza wzajemnej lokalizacji nieustrukturyzowanych fragmentów białka SERRATE (SE) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	93
Ryc. 35 Analiza wzajemnej lokalizacji nieustrukturyzowanych fragmentów białka SERRATE (SE) z AtPRP39a i AtCBP20 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	94
Ryc. 36 Analiza oddziaływania między nieustrukturyzowanymi fragmentami białka SERRATE (SE) i wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 oraz AtCBP20 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .	95
Ryc. 37 Lokalizacja białka fluorescencyjnego Cerulean (Cer), powstałego w wyniku oddziaływania białka SERRATE (SE) z AtPRP40b w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	96
Ryc. 38 Widmo emisji fluorescencji białka Cerulean (Cer), powstałego w wyniku oddziaływania białka SERRATE (SE) z AtPRP40b w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	97
Ryc. 39 Analiza wzajemnej lokalizacji białka Cerulean (Cer), powstałego w wyniku oddziaływania między białkiem SERRATE (SE) i AtPRP40b, z AtU1A-tRFP lub ustrukturyzowanym fragmentem SE (SE <sub>194-543</sub> ) w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	98
Ryc. 40 Analiza oddziaływania między kompleksem SERRATE (SE)/AtPRP40b oraz AtU1A przy zastosowaniu kombinacji BiFC i FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	99
Ryc. 41 Lokalizacja insercji T-DNA w genie kodującym białko SERRATE (SE) w mutancie se-2 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	100
Ryc. 42 Schemat wariantów białka SERRATE (SE) w roślinach typu dzikiego i w mutantach SE (se-1, se2), wykorzystywanych w analizach służących ocenie roli brakujących fragmentów SE w oddziaływaniu z partnerami snRNP U1 i w biogenezie miRNA .....	101
Ryc. 43 Analiza poziomu ekspresji SE w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach se-1 i se-2 przy zastosowaniu PCR w czasie rzeczywistym i Western blot.....	102

Ryc. 44 Analiza lokalizacji wariantów białka SERRATE (SE) pozbawionych 20 (SEΔ702-720) lub 40 (SEΔ681-720) aminokwasów z końca karboksylowego w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	103
Ryc. 45 Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka SERRATE (SE) pozbawionego 20 aminokwasów z końca karboksylowego (SEΔ702-720) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	104
Ryc. 46 Analiza wzajemnej lokalizacji wariantu białka SERRATE (SE) pozbawionego 40 aminokwasów z końca karboksylowego (SEΔ681-720) z wybranymi białkami wchodzącymi w skład snRNP U1 w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	105
Ryc. 47 Analiza oddziaływania między wariantami białka SERRATE, pozbawionymi 20 (SEΔ702-720) lub 40 (SEΔ681-720) aminokwasów z końca karboksylowego i wybranymi białkami kompleksu snRNP U1 lub AtCBP20 przy zastosowaniu FRET-FLIM w transfekowanych protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	106
Ryc. 48 Analiza dojrzewania pri-miR159b i pri-miR164c w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach se-1 i se-2 .....	108
Ryc. 49 Analiza stosunku izoform splicingowych pierwszego intronu At5g21100, zawierającego miR1888a w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach se-1 i se-2.....	110
Ryc. 50 Analiza poziomu pri-miR1888a w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach se-1 i se-2 .....	110
Ryc. 51 Analiza poziomu miR1888a w roślinach typu dzikiego (wt) oraz mutantach se-1 i se-2 .....	111
Ryc. 52 Schemat zaangażowania poszczególnych fragmentów białka SERRATE w oddziaływania z podstawowymi elementami biogenezy miRNA i snRNP U1.....	122
Ryc. 53 Model przedstawiający możliwą kolejność przyłączania się do pri-miRNA podstawowych białek zaangażowanych w biogenezę egzonowych (A) i intronowych (B) miRNA .....	124
Tabela 1 Elementy różnicujące biogenezę i funkcjonowanie miRNA w komórkach roślinnych i zwierzęcych .....	17
Tabela 2 Optymalne warunki nadekspresji białek SERRATE i GFP w fuzji białkiem wiążącym maltozę (MBP) w <i>E.coli</i> .....	60
Tabela 3 Zestawienie białek, zaangażowanych w biogenezę miRNA, oddziałujących z SERRATE (SE) .....	126

## LITERATURA

- Abovich N., Rosbash M. 1997. Cross-Intron Bridging Interactions in the Yeast Commitment Complex Are Conserved in Mammals. *Cell* 89(3): 403-412.
- Agranat-Tamir L., Shomron N., Sperling J., Sperling R. 2014. Interplay between pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis within the supraspliceosome. *Nucleic Acids Res* 42(7): 4640-4651.
- Alaba S., Piszczalka P., Pietrykowska H., Pacak A.M., Sierocka I., Nuc P.W., Singh K., Plewka P., Sułkowska A., Jarmołowski A., Karłowski W., Szweykowska-Kulińska Z. 2015. The liverwort *Pellia endiviifolia* shares microtranscriptomic traits that are common to green algae and land plants. *New Phytologist* 206: 352-367.
- Allen M., Friedler A., Schon O., Bycroft, M. 2002. The Structure of an FF Domain from Human HYPA/FBP11. *J Mol Biol* 323: 411-416.
- Allen E., Xie Z., Gustafson A.M., Carrington J.C. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- Andersen P.R., Domanski M., Kristiansen M.S., Storrval H., Ntini E., Verheggen C., Schein A., Bunkenborg J., Poser I., Hallais M., Sandberg R., Hyman A., LaCava J., Rout M.P., Andersen J.S., Bertrand E., Jensen T.H. 2013. The human cap-binding complex is functionally connected to the nuclear RNA exosome. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1367-1376.
- Aukerman M.J., Sakai H. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15(11): 2730-2741.
- Barabino S.M., Blencowe B.J., Ryder U., Sproat B.S., Lamond A.I. 1990. Targeted snRNP depletion reveals an additional role for mammalian U1 snRNP in spliceosome assembly. *Cell* 63: 293-302.
- Barciszewska-Pacak M., Milanowska K., Knop K., Bielewicz D., Nuc P., Plewka P., Pacak A.M., Vazquez F., Karłowski W., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2015. Arabidopsis microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 6:410.
- Barciszewska-Pacak M., Knop K., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2016. Arabidopsis thaliana microRNA162 level is posttranscriptionally regulated via splicing and polyadenylation site selection. *Acta Biochim Pol* doi: 10.18388/abp.2016\_1349.
- Baumberger N., Baulcombe D. 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11928-11933.
- Becerra S., Montes M., Hernández-Munain C., Suñé C. 2015. Prp40 pre-mRNA processing factor 40 homolog B (PRPF40B) associates with SF1 and U2AF65 and modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *RNA* 21: 438-457.

- Bedford M.T., Leder P. 1999. The FF domain: a novel motif that often accompanies WW domains. *Trends Biochem Sci* 24(7): 264-265.
- Berget S.M., Moore C., Sharp P.A. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3171-3175.
- Bielewicz D., Kalak M., Kalyna M., Windels D., Barta A., Vazquez F., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A. 2013. Introns of plant pri-miRNAs enhance miRNA biogenesis. *EMBO Rep* 14(7): 622-628.
- Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 13: 1097-1101.
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M. 2003. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113(1): 25-36.
- Brown J.W., Smith P., Simpson C.G. 1996. Arabidopsis consensus intron sequences. *Plant Mol Biol* 32: 531-535.
- Brown J.W., Marshall D.F., Echeverria M. 2008 Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in Plant Science* 13: 335-342.
- Boelens W.C., Jansen E.J. R., van Venrooij W.J., Stripecke R., Mattaj I.W., Gunderson S.I. 1993. The human U1 snRNP-specific U1A protein inhibits polyadenylation of its own pre-mRNA. *Cell* 72: 881-892.
- Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., Benning C. 1998. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J* 17: 170-180.
- 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. *Development* 130: 1493-1504.
- 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. *EMBO J* 28: 3646-3656.
- Boulon S., Verheggen C., Jady B.E., Girard C., Pescia C., Paul C., Ospina J.K., Kiss T., Matera A.G., Bordonné R., Bertrand E. 2004. PHAX and CRM1 Are Required Sequentially to Transport U3 snoRNA to Nucleoli. *Mol Cell* 16: 777-787.
- Boutet S., Vazquez F., Liu J., Beclin C., Fagard M., Gratias A., Morel J.B., Crete P., Chen X., Vaucheret H. 2003. Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgenic silencing and virus resistance. *Curr Biol* 13: 843-848.
- Bucherl C., Aker, J., de Vries S., Borst JW. 2010. Probing protein-protein Interactions with FRET-FLIM. *Methods Mol Biol* 655: 389-399.

- Carmo-Fonseca M., Tollervey D., Pepperkok R., Barabino S.M., Merdes A., Brunner C., Zamore P.D., Green M.R., Hurt E., Lamond A.I. 1991. Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO J* 10(1): 195–206.
- Chaabane S.B., Liu R., Chinnusamy V., Kwon Y., Park J-H., Kim S.Y., Zhu J-K., Yang S.W., Lee B-H. 2012. STA1, an Arabidopsis pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res* 41(3): 1984-1997.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(17): 7819-7823.
- Chen C.Z., Li L., Lodish H.F., Bartel D.P. 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303(5654): 83-86.
- Chen X. 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303(5666): 2022–2025.
- Cheng H., Dufu K., Lee C.S., Hsu J.L., Dias A., Reed R. 2006. Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. *Cell* 127: 1389-1400.
- Chiou T., Aung K., Lin S., Wu C., Chiang S., Su C. 2006. Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(2): 412–421.
- Cho S.K., Chaabane S.B., Shah P., Poulsen C.P., Yang S.W. 2014. COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nat Commun* 5: 5867.
- Colland F., Jacq X., Trouplin V., Mouglin C., Groizeleau C., Hamburger A., Meil A., Wojcik J., Legrain P., Gauthier J. M. 2004. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res* 14(7): 1324-32.
- Collier S., Pendle A., Boudonck K., van Rij T., Dolan L., Shaw P. 2005. A Distant Coilin Homologue Is Required for the Formation of Cajal Bodies in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* 17(7): 2942-2951.
- Cuellar T.L., McManus M.T. 2005. MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol* 187(3): 327-332.
- Dong Z., Han M.H., Fedoroff N. 2008. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9851-9852.
- Dufu K., Livingstone M.J., Seebacher J., Gygi S.P., Wilson S.A., Reed R. 2010. ATP is required for interactions between UAP56 and two conserved mRNA export proteins, Aly and CIP29, to assemble the TREX complex. *Genes Dev* 24: 2043-2053.
- Dzikiewicz-Krawczyk A., Piontek P., Szwejkowska-Kulińska Z., Jarmołowski A. 2008. The nuclear cap-binding complex is not essential for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in plants. *Acta Biochim Pol* 55(4): 825-829.

- Eamens A.L., Smith N.A., Curtin S.J., Wang M.B., Waterhouse P.M. 2009. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* 15(12): 2219-2235.
- Ester C., Uetz P. 2008. The FF domains of yeast U1 snRNP protein Prp40 mediate interactions with Luc7 and Snu71. *BMC Biochem* 9: 29.
- Fang Y., Spector D.L. 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr Biol*, 17: 818-823.
- Fang X., Cui Y., Li Y., Qi Y. 2015. Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 1.
- Flaherty S.M., Fortes P., Izaurralde E., Mattaj I.W., Gilmartin G.M. 1997. Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22): 11893-11898.
- Fortes P., Bilbao-Cortes D., Fornerod M., Rigaut G., Raymond W., Seraphin B., Mattaj I.W. 1999. Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5' splice site recognition. *Genes Dev* 13: 2425-2438.
- Fujioka Y., Utsumi M., Ohba Y., Watanabe Y. 2007. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 48: 1243-1253.
- Gall J.G., Tsvetkov A., Wu Z., Murphy C. 1995. Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? *Dev Genet* 16: 25-35.
- Gascioli V., Mallory A.C., Bartel D.P., Vaucheret H. 2005. Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 15: 1494-1500.
- Gebhardt A., Habjan M., Benda C., Meiler A., Haas D.A., Hein M.Y., Mann A., Mann M., Habermann B., Pichlmair A. 2015. mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP1 and NCBP3. *Nat Commun* 6: 8192.
- Goldstrohm A.C., Greenleaf A.L., Garcia-Blanco M.A. 2001. Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene* 277: 31-47.
- Golovkin M., Reddy A.S. 1996. Structure and expression of a plant U1 snRNP 70K gene: alternative splicing of U1 snRNP 70K pre-mRNAs produces two different transcripts. *Plant Cell* 8(8): 1421-1435.
- Golovkin M., Reddy A.S.N. 1998. The plant U1 small nuclear ribonucleoprotein particle 70K protein interacts with two novel serine/arginine-rich proteins. *Plant Cell* 10: 1637-1648.
- Golovkin M., Reddy A.S.N. 1999. An SC35-like protein and a novel serine/arginine-rich protein interact with *Arabidopsis* U1-70K protein. *J Biol Chem* 274: 36428-36438.

- Gornemann J., Barrandon Ch., Hujer K., Rutz B., Rigaut G., Kotovic K.M., Faux C., Neugebauer K.M., Seraphin B. 2011. Cotranscriptional spliceosome assembly and splicing are independent of the Prp40p WW domain. *RNA* 17: 2119-2129.
- Grigg S.P., Canales C., Hay A., Tsiantis M. 2005. SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis. *Nature* 437: 1022-1026.
- Gruber J.J., Zatechka D.S., Sabin L.R., Yong J., Lum J.J., Kong M., Zong W.X., Zhang Z., Lau C.K., Rawlings J., Cherry S., Ihle J.N., Dreyfuss G., Thompson C.B. 2009. Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* 138: 328-339.
- Ge H., Manley J.L. 1990. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62: 25-34.
- Gunnewiek J.M., Hussein R.I., van Aarssen Y., Palacios D., de Jong R., van Venrooij W.J., Gunderson SI. 2000. Fourteen residues of the U1 snRNP-specific U1A protein are required for homodimerization, cooperative RNA binding, and inhibition of polyadenylation. *Mol Cell Biol.* 20(6): 2209-2217.
- Haase A.D., Jaskiewicz L., Zhang H., Lainé S., Sack R., Gatignol A., Filipowicz W. 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6(10): 899-997.
- Hallais M., Pontvianne F., Andersen P.R., Clerici M., Lener D., Benbahouche N.E.H., Gostan T., Vandermoere F., Robert M.-C., Cusack S., Verheggen C., Jensen T.H., Bertrand E. 2013. CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1358-1366.
- Han J., Lee Y., Yeom K.-H., Kim Y.-K., Jin H., Kim V.N. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027.
- Harfe B.D., McManus M.T., Mansfield J.H., Hornstein E., Tabin C.J. 2005. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(31): 10898-10903.
- Hilleren P.J., Kao HY., Siliciano P.G. 1995. The amino-terminal domain of yeast U1-70K is necessary and sufficient for function. *Mol Cell Biol* 15(11): 6341-6350.
- 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.
- Huang Y., Ji L., Huang Q., Vassilyev D.G., Chen X., Ma J.B. 2009. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* 461: 823-827.
- Huntzinger E., Izaurralde E. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Rev Genet* 12: 99-110.

- Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M.C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Ishikawa M. 2010. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular Cell* 39: 282-291.
- Ingham R. J., Colwill K., Howard C., Dettwiler S., Lim C.S.H., Yu J., Hersi K., Raaijmakers J., Gish G., Mbamalu G., Taylor L., Yeung B., Vassilovski G., Amin M., Chen F., Matskova L., Winberg G., Ernberg I., Linding R., O'Donnell P., Starostine A., Keller W., Metalnikov P., Stark C., Pawson T. 2005. WW Domains Provide a Platform for the Assembly of Multiprotein Networks. *Mol Cell Biol* 25(16): 7092-7106.
- Iwata Y., Takahashi M., Fedoroff N.V., Hamdan S.M. 2013. Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Res* 41: 9129-9140.
- Izaurralde E., Lewis J., Gamberi Ch., Jarmołowski A., McGuigan C., Mattaj I.W. 1995. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* 376: 709-712.
- Janas M.M., Khaled M., Schubert S., Bernstein J.G., Golan D., Veguilla R.A., Fisher D.E., Shomron N., Levy C., Novina C.D. 2011. Feed-forward microprocessing and splicing activities at a microRNA-containing intron. *PLOS Genet* 7(10): e1002330.
- Jia F., Rock C.D. 2013. MIR846 and MIR842 comprise a cistronic MIRNA pair that is regulated by abscisic acid by alternative splicing in roots of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 81: 447-460.
- Jeong I.S., Aksoy E., Fukudome A., Akhter S., Hiragauri A., Fukuhara T., Bahk J.D., Koiwa H. 2013. Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 functions in miRNA accumulation and DNA methylation. *PLoS One* 8: e74739.
- Jimenez-Garcia L.F., Segura-Valdez M.L., Ochs R.L., Rothblum L.I., Hannan R., Spector D.L. 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 5(9): 955-966.
- Kaida D., Berg M.G., Younis I., Kasim M., Singh L.N., Wan L., Dreyfuss G. 2010. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* 468: 664-668.
- Kandels-Lewis S., Seraphin B. 1993. Involvement of U6 snRNA in 5 splice site selection. *Science* 262: 2035-2039.
- Kang Ch.H., Fenga, Y., Vikrama M., Jeongb, I.S., Leeb J.R., Bahkb J.D., Yunb D.J., Leeb S.Y., and Koiwa H. 2009. Arabidopsis thaliana PRP40s are RNA polymerase II C-terminal domain-associating proteins. *Arch Biochem Biophys* 484(1): 30-38.
- Kasschau K.D., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman E.J., Krizan K.A., Carrington J.C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* 4: 205-217.

- Ketting R.F., Fischer S.E.J, Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J, Plasterk R.H.A. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15: 2654-2659.
- Kierzkowski D., Kmiecik M., Piontek P., Wojtaszek P., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A. 2009. The Arabidopsis CBP20 targets the cap-binding complex to the nucleus, and is stabilized by CBP80. *Plant J* 59(5): 814-825.
- Kmiecik M., Simpson C.G., Lewandowska D., Brown J.W., Jarmolowski A. 2002. Cloning and characterization of two subunits of Arabidopsis thaliana nuclear cap-binding complex. *Gene* 283: 171-183.
- Knight S.W., Bass B.L. 2001. Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293(5538): 2269-2271.
- Knop K., Stępień A., Barciszewska-Pacak M., Taube M., Bielewicz D., Michalak M., Borst JW., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2016. Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of Arabidopsis microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkw895.
- Kolossova I., Padgett R.A. 1997. U11 snRNA interacts in vivo with the 5' splice site of U12-dependent (AU-AC) pre-mRNA introns. *RNA* 3(3): 227-233.
- Koster 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 AtGRP7 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 42: 9925-9936.
- Kozomara A., Griffiths-Jones S. 2013. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*: gkt1181.
- Kurihara Y., Watanabe Y. 2004. Arabidopsis microRNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12753-12758.
- 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: 206-212.
- Kruszka K., Pieczyński M., Windels D., Bielewicz D., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulińska Z., Vazquez F. 2012. Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *J Plant Physiol* 169: 1664-1672.
- Kruszka K., Pacak A., Świda-Barteczka A., Nuc P., Alaba S., Wróblewska Z., Karłowski W., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2014. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *J Exp Bot* 65: 6123-6135.
- Lai E.C. 2002. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30: 363-364.

- Lamond A.I., Earnshaw W.C. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280: 547-553.
- Laubinger S., Sachsenberg T., Zeller G., Busch W., Lohmann J.U., Ratsch G., Weigel D. 2008. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8795-8800.
- 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.
- Lee R.C. Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
- Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670.
- Lee Y., Ahn Ch., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim N.V. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.-H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060.
- Lei H., Dias A.P., Reed R. 2011. Export and stability of naturally intronless mRNAs require specific coding region sequences and the TREX mRNA export complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17985-17990.
- Lenasi T., Peterlin B.M., Barboric M. 2011. Cap-binding protein complex links pre-mRNA capping to transcription elongation and alternative splicing through positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J Biol Chem* 286: 22758-22768.
- Lewandowska D., Simpson C.G., Clark G.P., Jennings N.S., Barciszewska-Pacak M., Lin C.F., Makalowski W., Brown J.W., Jarmolowski A. 2004. Determinants of plant U12-dependent intron splicing efficiency. *Plant Cell* 16: 1340-1352.
- Lewis J.D., Izaurralde E., Jarmolowski A., McGuigan C., Mattaj I.W. 1996. A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev* 10(13): 1683-1698.
- Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Burge C.B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798.
- Li J., Yang Z., Yu B., Liu J., Chen X. 2005. Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15(16): 1501-1507.
- Li S., Liu L., Zhuang X., Yu Y., Liu X., Cui X., Ji L., Pan Z., Cao X., Mo B., Zhang F., Raikhel N., Jiang L., Chen X. 2013. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* 153: 562-574.

- Liao X.C., Colot H.V., Wang Y., Rosbash M. 1992. Requirements for U2 snRNP addition to yeast pre-mRNA. *Nucleic Acids Res* 20(16): 4237-4245.
- Lockhart S.R., Rymond B.C. 1994. Commitment of yeast pre-mRNA to the splicing pathway requires a novel U1 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide, Prp39p. *Mol Cell Biol* 14(6): 3623-3633.
- Lorkovic Z.J., Wieczorek Kirk D.A., Lambermon M.H., Filipowicz W. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci* 5(4): 160-167.
- Lorkovic Z.J., Barta A. 2008a. Role of Cajal Bodies and Nucleolus in the Maturation of the U1 snRNP in Arabidopsis. *PLoS ONE* 3(12): e3989.
- Lorkovic Z. J., Hilscher J., Barta A. 2008b. Co-localisation studies of Arabidopsis SR splicing factors reveal different types of speckles in plant cell nuclei. *Expl Cell Res* 314(17): 3175-3186.
- 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. *Plant Cell* 12: 2351-2366.
- Lu C., Jeong D.H., Kulkarni K., Pillay M., Nobuta K., German R., Thatcher S.R., Maher C., Zhang L., Ware D., Liu B., Cao X., Meyers B.C., Green P.J. 2008. Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4951-4956.
- Lubas K., Andersen P.R., Schein A., Dziembowski A., Kudla G., Jensen T.H. 2015. The Human Nuclear Exosome Targeting Complex Is Loaded onto Newly Synthesized RNA to Direct Early Ribonucleolysis. *Cell Rep* 10(2): 178-192.
- Machida S., Chen H-Y, Yuan Y.A. 2011. Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE. *Nucleic Acids Res* 39(17): 7828-7836.
- Macias M.J., Wiesner S., Sudol M. 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 513(1): 30-37.
- Mallory A.C., Dugas D.V., Bartel D.P., Bartel B. 2004a. MicroRNA Regulation of NAC-Domain Targets Is Required for Proper Formation and Separation of Adjacent Embryonic, Vegetative, and Floral Organs. *Curr Biol* 14(12): 1035-1046.
- Mallory A.C., Reinhart B.J., Jones-Rhoades M.W., Tang G., Zamore P.D., Barton M.K., Bartel D.P. 2004b. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J* 23: 3356-3364.
- 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: 859-870.

- Manders E., Stap J., Brakenhoff G., van Driel R., Aten J. 1992. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 103: 857-862.
- Meng Y., Shao C., Ma X., Wang H., Chen M. 2012. Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in Arabidopsis. *PLoS One* 7: e50870.
- Merchan F., Boualem A., Crespi M., Frugier F. 2009. Plant polycistronic precursors containing non-homologous microRNAs target transcripts encoding functionally related proteins. *Genome Biol* 10: R136.
- Morris D.P., Greenleaf A.L. 2000. The Splicing Factor, Prp40, Binds the Phosphorylated Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II. *J Biol Chem* 275: 39935-39943.
- Nelissen R.L.H, Heinrichs V., Habets W.J., Simons F., Luhrmann R., van Venrooij W.J. 1991. Zinc finger-like structure in U1-specific protein C is essential for specific binding to U1 snRNP. *Nucleic Acids Res* 9(3): 449-454.
- Nojima T., Hirose T., Kimura H., Hagiwara M. 2007. The Interaction between Cap-binding Complex and RNA Export Factor Is Required for Intronless mRNA Export. *J Biol Chem* 282: 15645-15651.
- O'Sullivan C., Christie J., Pienaar M., Gambling J., Nickerson P.E.B., Alford S.C., Alford S.C., Chowb R.L., Howard P.L. 2015. Mutagenesis of ARS2 Domains To Assess Possible Roles in Cell Cycle Progression and MicroRNA and Replication-Dependent Histone mRNA Biogenesis. *Mol Cell Biol* 35: 3753-3767.
- O'Sullivan C., Howard P.L. 2016. The diverse requirements of ARS2 in nuclear cap-binding complex-dependent RNA processing. *RNA & DISEASE* 3: e1376.
- Padgett R.A., Grabowski P.J., Konarska M.M., Seiler S., Sharp P.A. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 55: 1119-11150.
- 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. *Curr Biol* 12(17): 1484-1495.
- Park M.Y., Wu G., Gonzalez-Sulser A., Vaucheret H., Poethig R.S. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(10): 3691-3696.
- Parker J.S., Roe S.M., Barford D. 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J* 23: 4727-4737.
- Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., Macdonald .PE., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P., Stoffel M. 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432(7014): 226-230.
- Prigge M.J., Wagner D.R. 2001. The Arabidopsis Serrate gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *Plant Cell* 13: 1263-1279.

- Raczyńska K.D., Simpson C.G., Ciesiołka A., Szewc Ł., Lewandowska D., McNicol J., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J.W., Jarmołowski A. 2010. Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 38: 265-278.
- Raczyńska K.D., Stępień A., Kierzkowski D., Kalak M., Bajczyk M., McNicol J., Simpson C.G., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J.W., Jarmołowski A. 2014. The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 42(2): 1224-1244.
- Rajagopalan R., Vaucheret H., Trejo J., Bartel D.P. 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20: 3407-3425.
- Rappsilber J., Ryder U., Lamond A.I., Mann M. 2002. Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. *Genome Res* 12: 1231-1245.
- Raska I., Ochs R.L., Andrade L.E.C., Chan E.K.L., Burlingame R., Peebles C., Gruol D., Tan E.M. 1990. Association between the nucleolus and the coiled body. *J Struct Biol* 104(1): 120-127.
- Reddy A.S. 2004. Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing. *Trends in plant science* 9: 541-547.
- Reed R. 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev* 6: 215–220.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16(13): 1616–1626.
- Reis R.S., Hart-Smith G., Eamens A.L., Wilkins M.R., Waterhouse P.M. 2015. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nature Plants* 1: 14027.
- Ren G., Xie M., Dou Y., Zhang S., Zhang C., Yu B. 2012a. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 12817-12821.
- Ren G., Chen X., Yu B. 2012b. Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 22: 695-700.
- Rodrigues J.P., Rode M., Gatfield D., Blencowe B.J., Carmo-Fonseca M., Izaurralde E. 2001. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1030-1035.
- Rogers J., Wall R. 1980. A mechanism for RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(4): 1877-1879.

- Sabin L.R., Zhou R., Gruber J.J., Lukinova N., Bambina S., Berman A., Lau Ch.-K., Thompson C.B., Cherry S. 2009. *Ars2* regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell* 138: 340-351.
- Sakashita E., Tatsumi S., Werner D., Endo H., Mayeda, A. 2004. Human RNPS1 and its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo. *Mol Cell Biol* 24(3): 1174-1187.
- Schauer S.E., Jacobsen S.E., Meinke D.W., Ray A. 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7:487-491.
- Scherly D., Boelens W., van Venrooij W.J., Dathan N.A., Hamm J., Mattaj I.W. 1989. Identification of the RNA binding segment of human U1A protein and definition of its binding site on U1 snRNA. *EMBO J* 8(13): 4163-4170.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682.
- Schwab R., Speth C., Laubinger S., Voinnet O. 2013. Enhanced microRNA accumulation through stemloop-adjacent introns. *EMBO Rep* 14, 615-621.
- Seraphin B., Kretzner L., Rosbash M. 1988. A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome assembly but does not uniquely define the 5' cleavage site. *EMBO* 7(8): 2533-2538.
- Shaw P.J., Beven A.F., Leader D.J., Brown J.W.S. 1998. Localization and processing from a polycistronic precursor of novel snoRNAs in maize. *J Cell Sci* 111: 2121-2128.
- Shcherbakova I., Hoskins A.A., Friedman L.J., Serebrov V., Corrêa Jr. I.R., Xu M.Q., Gelles J., Moore. M.J. 2013. Alternative Spliceosome Assembly Pathways Revealed by Single-Molecule Fluorescence Microscopy. *Cell Rep*: 5(1): 151-165.
- Simpson G.G., Clark G.P., Rothnie H.M., Boelens W., Venrooij W., Brown J.W. 1995. Molecular characterization of the spliceosomal proteins U1A and U2B" from higher plants. *EMBO J* 14(18): 4540-4550.
- Song L., Han M-H, Lesicka J., Fedoroff N. 2007. *Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5437-5442.
- Speth C., Willing E.M., Rausch S., Schneeberger K., Laubinger S. 2013. RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in *Arabidopsis*. *Plant J* 76: 433-445.
- Sudol M., Chen H.I., Bougeret C., Einbond A., Bork P. 1995. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett* 369(1): 67-71.

- Sun Z., Guo T., Liu Y., Liu Q., Fang Y. 2015. The Roles of Arabidopsis CDF2 in Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Primary MicroRNAs. *PLOS Genet* 11: e1005598.
- Sunkar R., Zhu J.K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16(8): 2001-2019.
- Sunkar R., Jagadeeswaran G. 2008. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol* 8: 37.
- Szarzyńska B., Sobkowiak Ł., Pant B.D., Balazadeh S., Scheible W.R., Mueller-Roeber B., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2009. Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic Acids Res* 37: 3083-3093.
- Szweykowska-Kulińska Z., Jarmołowski A., Vazquez F. 2013. The crosstalk between plant microRNA biogenesis factors and the spliceosome. *Plant Signal Behav* 8(11): e26955.
- Tagami Y., Motose H., Watanabe Y. 2009. A dominant mutation in DCL1 suppresses the hyl1 mutant phenotype by promoting the processing of miRNA. *RNA* 15: 450-458.
- Tarn W.Y., Steitz J.A. 1997. Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem Sci* 22: 32-37.
- Tazi J., Kornstädt U., Rossi F., Jeanteur P., Cathala G., Brunel C., Lührmann R. 1993. Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing. *Nature* 363(6426): 283-286.
- Teigelkamp S., McGarvey M., Plumpton M., Beggs J.D. 1994. The splicing factor PRP2, a putative RNA helicase, interacts directly with pre-mRNA. *EMBO J* 13: 888-897.
- Tzfira T., Tian G.W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y., Krichevsky A., Taylor T., Vainstein A., Citovsky V. 2005. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol Biol* 57(4): 503-516.
- van Gelder C.W.G., Gunderson S.I., Jansen E.J.R., Boelens W.C., Polycarpou-Schwarz M., Mattaj I.W., van Venrooij W.J. 1993. A complex secondary structure in U1A pre-mRNA that binds two molecules of U1A protein is required for regulation of polyadenylation. *EMBO J* 12: 5191-5200.
- Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Pepers C., Gascioli V., Mallory A.C., Hilbert J.L., Bartel D.P., Crete P. 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis miRNAs. *Mol Cell* 16: 69-79.
- Vazquez F., Blevins T., Ailhas J., Boller T., Meins F Jr. 2008. Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Res* 36(20): 6429-6438.
- Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687.

- Waibel F., Filipowicz W. 1990. U6 snRNA genes of Arabidopsis are transcribed by RNA polymerase III but contain the same two upstream promoter elements as RNA polymerase II-transcribed U-snRNA genes. *Nucleic Acids Res* 18: 3451–3458.
- Wang B.B., Brendel V. 2004. The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol* 5(12): R102.
- Wang C., Tian, Q., Hou Z., Mucha M., Aukerman M., and Olsen O.-A. 2007. The Arabidopsis thaliana AT PRP39-1 gene, encoding a tetratricopeptide repeat protein with similarity to the yeast pre-mRNA processing protein PRP39, affects flowering time. *Plant Cell Rep* 26(8): 1357-1366.
- 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. *Plant Cell* 25: 715-727.
- Wang B., Duan Ch.-G., Wang X., Hou Y.-J., Yan J., Gao C., Kim J.-H. Zhang H., Zhu J.-K. 2015. HOS1 regulates Argonaute1 by promoting transcription of the microRNA gene MIR168b in Arabidopsis. *Plant J* 81(6): 861-870.
- Wassarman D.A., Steitz J.A. 1993. A base-pairing interaction between U2 and U6 small nuclear RNAs occurs in 150S complexes in HeLa cell extracts: implications for the spliceosome assembly pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(15): 7139-7143.
- Wilfred B.R., Wang W.X., Nelson P.T. 2007. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 91(3): 209-217.
- Will C.L., Behrens S.E., Luhrmann R. 1993. Protein composition of mammalian spliceosomal snRNP. *Mol Biol Rep* 18: 121-126.
- Will C.L., Lührmann R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13: 290-301.
- Wilson M.D., Wang D., Wagner R., Breysens H., Gertsenstein M., Lobe C., Lu X., Nagy A., Burke R.D., Koop B.F., Howard P.L. 2008. ARS2 is a conserved eukaryotic gene essential for early mammalian development. *Mol Cell Biol* 28: 1503-1514.
- Wu F., Yu L., Cao W., Mao Y., Liu Z., He Y. 2007. The N-terminal double-stranded RNA binding domains of Arabidopsis HYPOASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell* 19: 914-925.
- Wu X., Shi Y., Li J., Xu L., Fang Y., Li X., Qi Y. 2013. A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in Arabidopsis. *Cell Res* 23: 645-657.
- Xie Z., Allen E., Fahlgren N., Calamar A., Givan S.A., Carrington J.C. 2005a. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol* 138: 2145-2154.

- Xie Z., Allen E., Wilken A., Carrington J.C. 2005b. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*: 12984-12989.
- Yan K., Liu P., Wu C.A., Yang G.D., Xu R., Guo Q.H., Huang J.G., Zheng C.C. 2012. Stress-induced alternative splicing provides a mechanism for the regulation of microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell* *48*: 521-531.
- Yang L., Liu Z., Lu F., Dong A., Huang H. 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J* *47*: 841-850.
- Yang Z., Ebriht Y.W., Yu B., Chen X. 2006. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2'OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* *34*: 667-675.
- 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*: 594-605.
- Yang X., Zhang H., Li L. 2011. Global analysis of gene-level microRNA expression in *Arabidopsis* using deep sequencing data. *Genomics* *98*: 40-46.
- Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R.W., Steward R., Chen X. 2005. Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science* *307*(5711): 932-935.
- Zhan X., Wang B., Li H., Liu R., Kalia R.K., Zhu J.K., Chinnusamy V. 2012. *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* *109*: 19198-19203.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* *110*: 17588-17593.
- Zhang S., Liu Y., Yu B. 2014. PRL1, an RNA-Binding Protein, Positively Regulates the Accumulation of miRNAs and siRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* *10*, e:1004841.
- Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P., Reed R. 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* *419*: 182-185.
- Zhou Y., Zhu J., Schermann G., Ohle C., Bendrin K., Sugioka-Sugiyama R., Sugiyama T., Fischer T. 2015. The fission yeast MTREC complex targets CUTs and unspliced pre-mRNAs to the nuclear exosome. *Nat Commun* *6*: 7050.
- Zieleziński A., Dolata J., Alaba S., Kruszka K., Pacak A., Świda-Barteczka A., Knop K., Stępień A., Bielewicz D., Pietrykowska H., Sierocka I., Sobkowiak Ł., Lakomiak A., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z., Karłowski W. 2015. mirEX 2.0-an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs. *BMC Plant Biol* *15*: 144.