

MicroRNA (miRNA) są to krótkie cząsteczki RNA zaangażowane w regulację ekspresji wielu genów. Transkrybowane są przez RNA Polimerazę II jako pri-miRNA, które następnie ulegają przekształceniu w dojrzałe miRNA przy pomocy wielo-białkowego kompleksu zwanego Mikroprocesorem. Roślinny kompleks biogenezy miRNA składa się z endorybonukleazy DICER-LIKE 1 (DCL1) oraz wielu innych białek, w tym z białka SERRATE i HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1). W naszym laboratorium została potwierdzona rola SERRATE w biogenezie miRNA. W komórkach mutantu *se-1* zaobserwowano podwyższenie poziomu pri-miRNA oraz obniżenie ilości dojrzałego miRNA. Poza tym zbadano także udział SERRATE w alternatywnym splicingu. Wykorzystując metodę hybrydyzacji FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) odkryliśmy ciała jądrowe, które są miejscem gromadzenia prekursorów miRNA163. Nasze dotychczasowe badania potwierdziły również, że odkryte ciała nie są strukturami D (and. Dicing bodies, D-bodies), w których gromadzą się białka DCL1, SERRATE, HYL1. Potwierdziliśmy także brak kolokalizacji miRNA z białkiem U2B<sup>2</sup>, które specyficznym akumuluje się w ciałach Cajala (CB).

Celem projektu jest opisanie kolejnych komponentów znajdujących się w odkrytych przez nas ciałach jądrowych zawierających pri-miRNA163. Skupimy się również na wyjaśnieniu ich roli w transkrypcji, splicingu oraz degradacji miRNA. W tym celu przeprowadzimy hybrydyzację miRNA razem z immunolokalizacją pozostałych komponentów Dicing bodies: SERRATE oraz DCL1. Zbadamy także zmianę w liczbie ciał jądrowych w mutantach *hyl1*, *se-1*, *se-2*, *dcl1-7*, aby określić czy te białka mają wpływ na powstawanie struktur z pri-miRNA163. Wcześniejsze wyniki wskazują, że struktury jądrowe z pri-miRNA nie są ciałami Cajala. W mutancie *pcb-1* (nadekspresja koiliny) odkryliśmy jednak zmianę w lokalizacji pri-miRNA163, który gromadzi się na peryferiach jąderka. Dlatego przeprowadzimy podobne hybrydyzacje także w innych mutantach koiliny: *pcb-2* oraz *ncb*, aby zbadać związek odkrytych ciał z CB. Poza tym w projekcie skupimy się na analizie innych ciał jądrowych związanych ze splicingiem: nuclear speckles oraz paraspeckles, aby odnaleźć podobieństwo pomiędzy tymi ciałami, a strukturami znalezionymi przez nas.

Analiza roli ciał zawierających pri-miRNA163 w transkrypcji miRNA oparta będzie na hybrydyzacji miRNA z immunolokalizacją RNA Polimerazy II aktywnej transkrypcyjnie: fosforyzowanej na Serynie 5 w domenie CTD i Serynie 2 w domenie CTD. Zahamujemy również transkrypcję za pomocą  $\alpha$ -amanityny i ocenimy wpływ tej inhibicji na liczbę ciał, w których gromadzą się prekursorzy pri-miRNA. Przeprowadzimy również hybrydyzacje miRNA w mutantach podjednostek Mediatora: *med3*, *med5*, *med7*, *med9*, *med17* and *med18* oraz *med20a*. Mediator jest białkowym kompleksem zaangażowanym w rekrutację Pol II do promotora w czasie inicjacji transkrypcji.

Kolejnym punktem projektu będzie opisanie roli odkrytych ciał jądrowych w splicingu pri-miRNA. W tym celu wykonamy hybrydyzacje miRNA z lokalizacją białek zaangażowanych w splicing. Zbadamy także wpływ inhibicji splicingu na powstawanie tych struktur. W tym celu zastosujemy herboksydynę i staurosporynę. Przeprowadzimy także lokalizację miRNA w mutantach białek SR: *rs31-1*, *sr34-1*, *sr35-1*, *sr45-1*, *sc130a-1* i ocenimy zmiany w ilości i morfologii powstałych ciał jądrowych.

Poza transkrypcją i splicingiem zanalizujemy rolę odkrytych struktur zawierających prekursorzy miRNA163 w degradacji pri-miRNA i/lub jego fragmentów. W tym celu zlokalizujemy białka związanych z degradacją RNA, takie jak białka kompleksu usuwającego czapkę na końcu 5', białka kompleksu Egzosomu i NEXT. Kompleks Egzosomu degraduje RNA od końca 3' i rekrutowany jest do cząsteczki RNA poprzez kompleks NEXT. W projekcie zbadamy zmianę w lokalizacji pri-miRNA w mutantach z zaburzoną degradacją RNA: *xrn2-3*, *xrn3-3*, *xrn4-3*, *dcp1*, *hen2*.

W dotychczasowych badaniach zlokalizowaliśmy pri-miRNA163 oraz formę dojrzałą miRNA163. W tym projekcie chcemy zbadać lokalizację także innych cząsteczek pri-miRNA. Naszą uwagę skupimy na pri-miRNA156a, pri-miRNA158a i pri-miRNA160a, których struktura jest podobna do pri-miRNA163 oraz miRNA157a i pri-165 nie posiadające intronu.

Wyniki doświadczeń pozwolą określić rolę odkrytych ciał jądrowych zawierających pri-miRNA163 w transkrypcji, splicingu oraz degradacji miRNA. Poszerzą także wiedzę na temat biogenezy miRNA w komórkach roślinnych.