

Celem niniejszego projektu jest charakterystyka dziewięciu nowych, jęczmiennych miRNA zidentyfikowanych w Zakładzie Ekspresji Genów.

Jęczmień jest jednym z najważniejszych zbóż na świecie. Pod względem globalnej produkcji plasuje się na czwartym miejscu, zaraz po kukurydzy, ryżu i pszenicy. Gatunki hodowane dzisiaj pochodzą od dzikiej odmiany – *Hordeum vulgare ssp. spontaneum*, której udomowienie nastąpiło około 10 000 lat temu w okolicach delty Nilu, w rejonie nazywanym Żywnym Półksiężycem. Dzisiaj jęczmień jest zbożem pastewnym oraz czołowym ziarnem w browarnictwie.

MiRNA to małe cząsteczki liczące zazwyczaj 21 nukleotydów, które włączone w kompleks białkowy RISC (RNA-induced silencing complex) regulują ekspresje genów na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Pierwsze miRNA roślinne zidentyfikowano ponad dekadę temu w toku badań nad orgaznitem modelowym *Arabidopsis thaliana*. Już w tedy badacze wnioskowali o istotnej roli tych cząsteczek w rozwoju rośliny. Od tego czasu przypuszczenia zostały potwierdzone, natomiast badania nad miRNA rozszerzono na inne gatunki, w tym zboża. **Obecnie zidentyfikowano 71 dojrzałych miRNA w jęczmieniu. Ta liczba wydaje się mała w porównaniu z innymi zbożami, w genomie których odnotowało setki tego rodzaju cząsteczek. Fakt ten pozwala wnioskować o obecności wielu dotychczas niezbadanych miRNA, a co za tym idzie wielu nieopisanych mechanizmów regulatorowych. Naszym celem jest uzupełnienie tych różnic i zidentyfikowanie oraz scharakteryzowanie dotychczas nieopisanych miRNA w jęczmieniu i procesów jakie regulują.**

Aby zrealizować postawione zadanie w ramach badań wstępnych do naszego projektu wykonaliśmy głębokie sekwencjonowanie bibliotek sRNA z pięciu stadiów rozwojowych jęczmienia a następnie we współpracy z Zakładem Biologii Obliczeniowej UAM zidentyfikowaliśmy potencjalne nowe miRNA jęczmienne. Istnienie dziewięciu z nich potwierdziliśmy za pomocą hybrydyzacji Northern. Następnie wykorzystując ogólnodostępne bazy danych określiliśmy strukturę ich prekursorów (pre-miRNA) oraz zbadaliśmy poziom pri-miRNA na etapach rozwojowych jęczmienia i w ogranach pojedynczego kwiatu. Zaobserwowaliśmy wysoką ekspresję transkryptów w stadium kłosa oraz interesujące zmiany w poszczególnych organach kwiatowych. Naszą uwagę szczególnie zwróciły cztery pri-miRNA, których ekspresja była znacznie zwiększona w pręcikach, sugerując zaangażowanie w funkcję i rozwój tego organu. Przeanalizowaliśmy także liczby zczytań dla naszych miRNA w bibliotekach sRNA pochodzących ze stresu suszy i zauważyliśmy znaczne zmiany ilościowe poszczególnych miRNA pomiędzy warunkami łagodnego i silnego stresu.

Te wyniki skłoniły nas do postawienia hipotezy stwierdzającej zaangażowanie nowych jęczmiennych miRNA w rozwój jęczmienia, szczególnie na etapie formowania kwiatu, oraz w odpowiedź na stesy środowiskowe. Aby dopełnić charakterystykę naszych cząsteczek w toku tego projektu planujemy przeprowadzić analizę ekspresji oraz lokalizacji dojrzałych miRNA za pomocą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond typu TagMan, jak również analizę ich zachowanie w różnych warunkach stresowych (hybrydyzacja Northern). Ponadto planujemy identyfikację genów docelowych dla wszystkich badanych miRNA poprzez analizę danych degradacyjnych. Aby określić mechanizmy regulacji potranskrypcyjnej genów kodujących nowe jęczmienne miRNA przeprowadzimy eksperymenty typu RACE, pozwalające na amplifikację pełnej długości cDNA. Końcowym krokiem będzie wybranie najbardziej interesujących dla nas miRNA i przygotowanie linii roślin transgenicznych z wyciszoną funkcją badanych miRNA, za pomocą gąbki molekularnej sekwestrującej miRNA, aby określić fenotyp otrzymanych roślin i ostatecznie potwierdzić ścieżki regulowane przez nowy miRNA w jęczmieniu.