

## Popularnonaukowe streszczenie projektu

Celem niniejszego projektu jest poznanie funkcji i roli biologicznej zidentyfikowanych bioinformatycznie przeze mnie w Zakładzie Ekspresji Genów białek lub lncRNA kodowanych przez geny *MIR444* w jęczmieniu.

Jęczmień należy do najważniejszych zbóż na świecie. Pod względem globalnej produkcji plasuje się na czwartym miejscu, zaraz po kukurydzy, ryżu i pszenicy. Najstarsze znane dowody na uprawę jęczmienia pochodzą z Bliskiego Wschodu i są datowane na VII tysiąclecie p. n. e. Obecnie jęczmień zwyczajny znajduje zastosowanie jako podstawowy surowiec do produkcji słodu jęczmiennego w browarnictwie oraz do produkcji kasz.

MikroRNA to małe, zazwyczaj 21 nukleotydowe cząsteczki, które włączone w wielobiałkowy kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) regulują ekspresję genów na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Członkowie rodziny mikroRNA z rodziny *MIR444* są szczególnie interesujący, ponieważ występują tylko u roślin jednoliściennych. W Zakładzie Ekspresji Genów zidentyfikowano trzy geny *MIR444* w jęczmieniu. Wykazano, że pierwotne transkrypty (pri-miRNA) tych genów podlegają alternatywnemu splicingowi generując wiele izoform, które podzielono na dwie klasy: funkcjonalne (generujące mikroRNA) i niefunkcjonalne (niegenerujące mikroRNA). We wszystkich izoformach zidentyfikowano otwarte ramki odczytu (ORFs, ang. *open reading frames*). Z wykorzystaniem techniki profilowania polisomów potwierdzono, że niektóre izoformy są zasocjowane z rybosomami w korzeniu w warunkach stresu nadmiaru azotu. Ponadto potwierdziliśmy obecność białka o długości 168 aminokwasów (pochodzącego z genu *MIR444c*) w bakteriiach *Escherichia coli* przy użyciu techniki Western Blot. Ostatnie doniesienia literaturowe wykazały, że roślinne pri-miRNA mogą kodować białka stymulujące biogenezę mikroRNA (Laouressgues i in., 2015). W świetle tych danych, uzyskane przez nas wyniki wstępne mogą świadczyć o nowej, nieopisananej jeszcze w jęczmieniu funkcji pri-miRNA.

Celem projektu jest eksperymentalna weryfikacja hipotezy zgodnie z którą pierwotne transkrypty mikroRNA z rodziny *MIR444* są eksportowane z jądra do cytoplazmy, gdzie mogą ulegać translacji jak mRNA lub działać jak długie niekodujące RNA. Planujemy przeprowadzić transformację pyłku jęczmienia w celu uzyskania roślin transgenicznych z delecją sekwencji kodujących wybrane białka (przy użyciu techniki CRISPR/Cas9) oraz z nadekspresją genów kodujących zidentyfikowane białka. W tym zadaniu wykorzystamy konstrukty przygotowane we współpracy z The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK). Dokonamy obserwacji wzrostu roślin i ekspresji wybranych genów kandydatów w warunkach kontrolnych i nadmiaru azotu. Sprawdzimy czy zidentyfikowane białka mają wpływ na biogenezę mikroRNA (eksperyment sekwencjonowania małych RNA). Linie transgeniczne jęczmienia z nadekspresją genów kodujących zidentyfikowane przez nas białka wykorzystamy również do eksperymentu koimmunoprecypitacji. Na tej podstawie otrzymamy informacje, które pozwolą zidentyfikować potencjalnych partnerów białkowych zidentyfikowanych przez nas białek. Ponadto również przeanalizujemy odpowiedź roślin z wyprowadzonych linii transgenicznych w warunkach stresu nadmiaru azotu.

Uzyskane przez nas wyniki pozwolą określić funkcję i rolę biologiczną białek lub lncRNA kodowanych przez geny *MIR444* w jęczmieniu oraz w znacznym stopniu przyczynią się do zrozumienia procesów rozwojowych tak ważnej rośliny uprawnej jaką jest jęczmień.