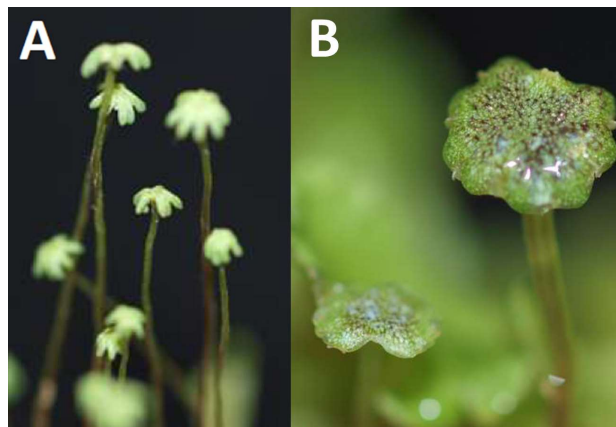


## Sieć powiązań wątrobowcowo-specyficznych mikroRNA i ich docelowych mRNA w rozmnażaniu generatywnym *Marchantia polymorpha*

Wątrobowce (Marchantiophyta) zaliczane są do grupy najstarszych, żyjących współcześnie roślin lądowych. Ze względu na swój pierwotny charakter, są bardzo dobrym obiektem do prowadzenia ewolucyjnych analiz dotyczących biologii rozwoju („evo-devo”). Materiałem naszych badań jest, należąca do klasy Marchantiopsida, porostnica wielokształtna (*Marchantia polymorpha*). Jest to rozdzielnopłciowa roślina wytwarzająca - plechy żeńskie, na których powstają rodniostrany (archegoniofory) z rodniami (Zdj.1A) oraz oddzielnie - plechy męskie z plemniostanami (anteridioforami) zawierającymi plemniki (Zdj.1B). Są to złożone organy generatywne, mające kluczowe znaczenie w rozmnażaniu płciowym porostnicy. W roślinach kwiatowych rozwój kwiatu, czas kwitnienia i zapłodnienie są regulowane, między innymi, przez cząsteczki zwane mikroRNA (miRNA), będące krótkimi, niekodującymi RNA. Cząsteczki te regulują poziom ekspresji genów poprzez kierowanie rozcinaniem mRNA lub kierowanie blokowaniem translacji mRNA. W przedstawianym projekcie, chcemy zbadać, czy kontrola powstawania organów generatywnych, ich rozwoju oraz płodności roślin w procesie rozmnażania płciowego wątrobowców odbywa się przy udziale tych cząsteczek. Szczególnie interesujące są te miRNA, które występują tylko w grupie wątrobowców. Zatem **kluczowymi zadaniami do wykonania w naszym projekcie będą (1) scharakteryzowanie wątrobowcowo-specyficznych miRNA, które wykazują zróżnicowany profil ekspresji w plechach generatywnych *Marchantia*: charakterystyka ich genów, pierwotnych transkryptów (pri-miRNA), poznanie szczegółowego profilu ekspresji, (2) opisanie funkcji wybranych miRNA i genów kodujących ich docelowe mRNA oraz stworzenie modelu pokazującego sieć powiązań miRNA i ich docelowych mRNA w kontroli procesu rozmnażania płciowego najstarszych roślin lądowych.**

Posiadamy wstępne wyniki, udowadniające, że siedem rodzin wątrobowcowo-specyficznych miRNA, wykazuje zróżnicowany profil ekspresji w plechach generatywnych porostnicy. Dla tych miRNA zidentyfikowaliśmy również mRNA będące celem ich działania. Zamierzamy przeanalizować funkcję genów kodujących mRNA docelowe dla badanych miRNA. Przygotujemy szereg linii mutantów nadekspresyjujących wybrane miRNA/geny docelowe oraz mutanty CRISPR/Cas9 z „wyłączonymi” genami kodującymi wybrane miRNA/geny docelowe. Charakterystyka fenotypów mutantów (włącznie z oszacowaniem ich zdolności do rozmnażania płciowego) umożliwi nam określenie faktycznych funkcji pełnionych przez te miRNA i przez geny będące pod ich kontrolą. Jednym z takich genów docelowych dla specyficznego miRNA (miR8185) jest fosfataza o podwójnej specyficzności - DUSP12. Przeprowadzając eksperymenty ko-immunoprecypitacji białek oraz identyfikacji białek metodą spektrometrii mas, wyznaczymy potencjalnych białkowych partnerów oddziałujących z DUSP12 i przebadamy ich rolę w rozmnażaniu generatywnym *Marchantia*. Stosując badania transkryptomyczne porównamy transkryptomy mutantów z brakiem miR8185, nadekspresją DUSP12 i roślin typu dzikiego. Wyszukamy geny zmieniające swój profil ekspresji w ten sam sposób u obu mutantów, a uzyskane wyniki odniesiemy do wyników eksperymentu co-IP, a tym samym scharakteryzujemy wzajemne sieci powiązań pomiędzy zidentyfikowanymi białkami. Zaproponujemy model sieci zależności pomiędzy poznanymi miRNA - docelowymi mRNA w kontroli rozwoju organów generatywnych i zapłodnienia u wątrobowców. Uzyskane przez nas wyniki w znaczący sposób wpłyną na uzupełnienie luki w wiedzy na temat roli miRNA w rozmnażaniu płciowym pierwszych roślin lądowych, a także będą miały istotny wpływ na poszerzenie wiedzy o regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój organów rozmnażania generatywnego roślin.



Zdj.1. Archegoniofory (A) i anteridiofory (B) *M. polymorpha*