

Streszczenie

MicroRNA (miRNA) są to krótkie cząsteczki RNA biorące udział w regulacji ekspresji wielu genów. Transkrybowane są przez polimerazę RNA II (RNAPII) jako prekursorowe miRNA (pri-miRNA), które następnie ulegają przekształceniu w dojrzałe cząsteczki miRNA z udziałem kompleksu nazywanego mikroprocesorem. Kompleks ten jest zbudowany z trzech głównych białek: endorybonukleazy DCL1 (Dicer like 1), SERRATE oraz HYL1 (Hyponasic Leaves 1). Z mikroprocesorem oddziałują także inne białka, takie jak: TGH (TOUGH), helikaza CHR2 (Chromatin Remodeling Factor 2), fosfataza CPL1 (C-Terminal Domain Phosphatase-like), SMA1 (Small 1), HOS1 (High Expression of Osmotically Responsive Genes 1), CDF2 (Cyclin DOF 2), NOT2a oraz NOT2b (Negative on TATA Less 2). Poza biogenezą miRNA, białko SERRATE zaangażowane jest w proces alternatywnego splicingu, oddziałuje z kompleksem CBC oraz białkami pomocniczymi U1 snRNP, takimi jak PRP40. Ponieważ PRP40 oddziałuje również z domeną CTD polimerazy RNA II (RNAPII), może pośredniczyć w komunikacji pomiędzy polimerazą a mikroprocesorem. W niniejszej pracy postanowiłem zbadać rolę białka PRP40 w komunikacji pomiędzy transkrypcją, splicingiem oraz biogenezą miRNA. Wykorzystując metody mikroskopii konfokalnej pokazałem, że PRP40 pośredniczy w asocjacji U1-70K oraz SERRATE z kompleksem RNAPII. W mutancie *prp40ab* zaobserwowałem spadek kolokalizacji obu tych białek z aktywną transkrypcyjnie RNAPII (z fosforylowaną seryną 5 i seryną 2 w domenie CTD). Poza tym, w mutancie *prp40ab* oraz *se-2* obniżeniu ulega także asocjacja DCL1 z kompleksem RNAPII. Otrzymane dane wskazują, że PRP40 i SERRATE wpływają na kolokalizację DCL1 i RNAPII. W przeciwieństwie do tego, asocjacja białka HYL1 z aktywną transkrypcyjnie RNAPII jest niezależna od SERRATE. Otrzymane dane pozwoliły mi zaproponować model kotranskrypcyjnego tworzenia kompleksu mikroprocesora i rozpoznania miejsca splicingowego 5'. Zgodnie z nim, białko PRP40, oddziałując z domeną CTD RNAPII, pośredniczy w asocjacji SERRATE z RNAPII. Na etapie inicjacji transkrypcji, do kompleksu RNAPII dołącza także białko HYL1, jednak jego asocjacja z kompleksem polimerazy RNA II jest niezależna od SERRATE. Następnie, w trakcie elongacji, do kompleksu RNAPII rekrutowany jest U1 snRNP, jeżeli w powstającym miRNA znajduje miejsce 5' SS. Na tym etapie do mikroprocesora dołącza także białko DCL1, przy czym jego asocjacja z kompleksem RNAPII regulowana jest przez PRP40 oraz SERRATE. Obecnie uważa się, że miejscem biogenezy miRNA są struktury D (ang. dicing bodies, D-bodies). Wykorzystując metody mikroskopowe, takie jak hybrydyzacja FISH (ang. fluorescence *in situ* hybridization) oraz RNA Stellaris, zlokalizowałem pri-miRNA163 oraz pri-miRNA156a w jądrze komórkowym. Oba te prekursor gromadzą się w specyficznych ciałach jądrowych. Przeprowadzone badania pokazały jednak, że opisane przez mnie struktury, chociaż zawierają nowe transkrypty oraz białka biorące udział w biogenezie miRNA, nie są ciałami D. Wyniki moich badań wskazują, że biogeneza miRNA u roślin jest procesem kotranskrypcyjnym.