

## Streszczenie

---

Wszystkie eukariotyczne RNA transkrybowane przez polimerazę RNA II powstają z pierwotnych prekursorów na drodze wieloetapowej obróbki obejmującej między innymi dodawanie czapeczki (kapu) do końców 5', wycinanie intronów i łączenie ze sobą egzonów (splicing) oraz dodawanie ogonów poli(A) podczas procesu cięcia i poliadenylacji końca 3'. Za wycinanie intronów i łączenie ze sobą egzonów odpowiedzialny jest wysoce dynamiczny i złożony kompleks zwany spliceosomem, w skład którego wchodzi jądrowe cząstki rybonukleoproteinowe U1, U2, U4, U6 i U5 snRNP, a także inne białka niezwiązane z wymienionymi snRNP. Pomimo tego, że w spliceosomie wszystkie snRNP występują w jednakowej stechiometrii, to U1 snRNP jest najliczniej występującym snRNP w jądrze komórkowym. Opublikowane dane pokazują, że poza udziałem w splicingu U1 snRNP pełni także dodatkową funkcję. W komórkach ludzkich U1 snRNP chroni syntetyzowane transkrypty przed zakończeniem transkrypcji, spowodowanym ich przedwczesną poliadenylacją. Ta dodatkowa funkcja U1 snRNP została nazwana teleskryptingiem (ang. *telescripting*). Nasze wcześniejsze badania dotyczące regulacji ekspresji genów miRNA (*MIR*) u *Arabidopsis thaliana*, sugerują występowanie podobnego mechanizmu u roślin. Zaobserwowaliśmy, że wiązanie U1 snRNP do miejsca splicingowego 5' hamuje wybór sąsiadującego z nim miejsca poliadenylacji. Nasze wyniki wskazują, że kompleks U1 snRNP bierze udział w regulacji poliadenylacji zarówno w komórkach ludzkich, jak i w komórkach roślinnych.

W celu zrozumienia molekularnego mechanizmu łączącego U1 snRNP z maszyną poliadenylacyjną zidentyfikowano białka kompleksu poliadenylującego, które kontaktują się z U1 snRNP. Były to białka homologiczne do podjednostek ludzkiego kompleksu CFI<sub>m</sub> (ang. *mammalian Cleavage Factor I*). W tej pracy po raz pierwszy scharakteryzowano wszystkie podjednostki roślinnego kompleksu CFI (AtCFI): białka AtCFI25, AtCFI59 i AtCFI68 oraz opisano ich wzajemne oddziaływanie. Wykazano, że białko AtCFI25 tworzy rdzeń kompleksu CFI u roślin, oddziałując zarówno z AtCFI59, jak i AtCFI68. Potwierdzono również specyficzne dla *A. thaliana* oddziaływanie białka AtCFI25 z czynnikiem poliadenylacyjnym AtFIPS5.

Zidentyfikowano i scharakteryzowano także mutanty T-DNA wszystkich podjednostek kompleksu AtCFI. Zaobserwowano podobieństwo fenotypu roślin z unieczynnionym białkiem AtCFI25 do fenotypu roślin z podwójną mutacją białek AtCFI59 i AtCFI68, co sugeruje funkcjonowanie białek AtCFI25, AtCFI59 i AtCFI68 w ramach jednego kompleksu.

Obserwowany fenotyp roślin z podwójną mutacją białek AtCFI59 i AtCFI68, dowodzi również funkcjonalnemu zastępowaniu się podjednostek AtCFI59 i AtCFI68 w kompleksie AtCFI.

W celu lepszego zrozumienia sposobu powiązania AtCFI z U1 snRNP zidentyfikowano partnerów białkowych wszystkich podjednostek kompleksu AtCFI oraz białka AtFIPS5. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów ujawniono oddziaływania badanych białek z licznymi białkami splicingowymi oraz grupą helikaz należących do rodziny DEAD-box. Wyniki przeprowadzonych koimmunoprecypitacji pokazują również powiązanie kompleksu AtCFI z białkami należącymi do kompleksu TREX, co świadczy o związku procesów eksportu jądrowego z procesami formowania końców 3'.

Przy pomocy techniki 3' RACE oraz z użyciem sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq) w mutantach kompleksu CFI, przeanalizowano rolę podjednostek kompleksu CFI w procesie poliadenylacji u *A. thaliana*. Ujawniono, że kompleks AtCFI bierze udział w przedwczesnej poliadenylacji w intronach, co sugeruje jego zaangażowanie w proces hamowania poliadenylacji przez U1 snRNP (teleskryptyng) u roślin. Dodatkowo, w mutantach białek kompleksu AtCFI zidentyfikowano zdarzenia typu "readthrough", czyli przykłady transkryptów polimerazy RNA II o wydłużonych na końcach 3'. Dowiedziono w ten sposób, że kompleks AtCFI jest także zaangażowany w proces formowania właściwych końców 3' transkryptów polimerazy RNA II.

## Abstract

---

All eukaryotic RNA Polymerase II mature RNAs are produced from primary transcripts as a result of extensive processing, including addition of the cap structure at the 5' end, removal of introns and ligation of exons (splicing), and addition of a poly(A) tail at the 3' end during the cleavage and polyadenylation. The excision of introns from primary transcripts is catalyzed by a highly dynamic and large ribonucleoprotein complex called the spliceosome, composed of U1, U2, U4, U6 and U5 snRNPs, as well as other spliceosomal proteins. Although one to one stoichiometry of all spliceosomal snRNPs is needed for spliceosome activity, in the nucleus U1 snRNP is present in a large excess over all other snRNPs. This points towards additional functions of U1 snRNP beyond splicing. Indeed, it has been shown in human cells that U1 snRNP is also important for inhibition of premature polyadenylation sites. This U1 snRNP activity is known as telescripting. Our previous study, concerning regulation of expression of miRNA genes, describes a similar mechanism in *A. thaliana*. We found that the active 5'ss inhibits utilization of the nearest downstream polyadenylation site. Thus, both in mammals and plants, U1 snRNP seems to control polyadenylation.

In order to understand the molecular interplay between U1 snRNP and the polyadenylation machinery, the polyadenylation factors which associate with the U1 snRNP were identified. These proteins were homologous to the subunits of the human complex CFIm (ang. *mammalian Cleavage Factor I*). During this study all subunits (AtCFI25, AtCFI59 and AtCFI68 proteins) of the plant CFI complex (AtCFI) were characterized for the first time and the interactions between them were described. It was shown that the AtCFI25 protein is the core of the complex and it is interacting with both the AtCFI59 protein and AtCFI68 protein. It was also confirmed that the AtCFI25 is interacting with the AtFIPS5 polyadenylation factor. This interaction is specific to *A. thaliana*. Next, the T-DNA mutants of all CFI subunits were identified and characterized, and phenotypic similarities between the mutant of AtCFI25 protein and the double mutant of AtCFI59 and AtCFI68 proteins were observed. This phenotypic similarity proves that AtCFI25, AtCFI59 and AtCFI68 are working together as a complex and it also demonstrates the functional substitution of subunits AtCFI59 and AtCFI68.

Moreover, in order to better understand the crosstalk of AtCFI complex with the U1 snRNP, it was decided to identify protein partners of all of the *A. thaliana* subunits of CFI complex, as well as the AtFIPS5 protein. As a result of a series of co-immunoprecipitation experiments the strong association of AtCFI components with numerous splicing factors and

groups of DEAD-box helicases was discovered. The co-immunoprecipitation results showed also an association of AtCFI with the components of the TREX complex, which indicates a connection of the polyadenylation process with nuclear export.

The role of CFI complex subunits in the polyadenylation process in *A. thaliana* was analyzed using the 3' RACE technique and next-generation sequencing (RNA-seq) in CFI mutant plants, revealing its involvement in the intronic polyadenylation and confirming its implication in telescripting. In addition, examples of extensions of RNA polymerase II transcripts at the 3' ends were identified in CFI mutants, showing that the CFI complex plays also a key role in formation of proper 3' ends of the RNA pol II transcripts.

