

## STRESZCZENIE

**Wstęp:** Procesy odpowiedzialne za regulację ekspresji genów warunkują życie i są szczególnie istotne w zmieniających się warunkach środowiska. Kluczowym elementem tej sieci regulacyjnej są mikroRNA (miRNA). Te krótkie jednoniciowe fragmenty RNA regulują poziom białek poprzez cięcie docelowych mRNA bądź hamowanie ich translacji. Biogeneza miRNA u roślin jest bardzo skomplikowanym i wciąż nie do końca poznany procesem, zachodzącym na terenie jądra komórkowego. Geny miRNA u roślin tworzą najczęściej niezależne jednostki transkrypcyjne i są przepisywane na długie niekodujące transkrypty, które zawierają miRNA zarówno w intronach, jak i egzonach takich prekursorów (pri-miRNA). Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na niezwykle istotną zależność wydajności biogenezy miRNA od wycinania intronów znajdujących się w ich prekursorach. Nie scharakteryzowano jednak do tej pory elementów komórkowych odpowiedzialnych za tą regulację.

**Cel pracy:** Celem pracy była identyfikacja białek odpowiedzialnych za powiązanie maszynerii biogenezy miRNA i splicingowej oraz charakterystyka tych oddziaływań.

**Wyniki:** Wykazano bezpośrednie oddziaływanie między SERRATE (SE), jednym z głównych białek maszynerii biogenezy miRNA, i obydwoma podjednostkami jądrowego kompleksu wiążącego czapkę (AtCBC, ang. *cap binding complex*). Zaobserwowano tworzenie się potrójnego kompleksu składającego się z SE, AtCBP80 i AtCBP20 oraz stabilizację oddziaływań między jego komponentami w porównaniu z indywidualnymi oddziaływaniami SE-AtCBP20 i SE-AtCBP80. Ustrukturyzowany centralny rdzeń SE okazał się być wystarczającym fragmentem białka do budowania kompleksu z AtCBP20 i 80. Kompleks ten stanowi podstawę molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za rolę SE i AtCBC w regulacji splicingu pre-mRNA i biogenezy miRNA.

Zidentyfikowano również bezpośrednie oddziaływania między SE i czterema pomocniczymi białkami kompleksu snRNP U1, tj. AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl. W oddziaływania te zaangażowane są nieustrukturyzowane końce SE, które okazały się być wystarczającą częścią białka do związania trzech (AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl) z czterech białek pomocniczych snRNP U1. Związanie AtPRP39b wymaga prawdopodobnie obecności innych fragmentów SE. W linii *A. thaliana se-2*, w której obecna wersja SE pozbawiona jest zdolności do kontaktu z białkami snRNP U1, odnotowano zmiany

splicingu i wydajności biogenezy miR1888a w stosunku do roślin z aktywnym połączeniem SE-snRNP U1. Ponadto, wykazana nieobecność SE i pomocniczych białek snRNP U1 w ciałach Cajala potwierdza brak bezpośredniego powiązania między tymi strukturami i dojrzewaniem prekursorów miRNA, zależnym od wspomnianych białek.

Wyniki niniejszej pracy pozwoliły zaproponować model przyłączania się białek zaangażowanych w biogenezę miRNA do ich pierwotnego prekursorów, w którym SE pełni rolę platformy łączącej elementy mikroprocesora, spliceosomu i kompleksu wiążącego czapkę.

## ABSTRACT

**Introduction:** The mechanisms responsible for the gene expression regulation determine survival in a changing environment. microRNAs (miRNAs) are key components of this regulatory network. These single-stranded RNAs regulate the protein levels by cleavage of mRNA or translation inhibition. Plant microRNA biogenesis is a very complex, and still not fully understood process, that occurs in the cell nucleus. In plants, miRNAs are encoded mostly by independent transcription units, that are transcribed to long noncoding primary precursors (pri-miRNAs). These pri-miRNAs may contain miRNA sequences in introns or exons. Until now, an interplay between miRNA biogenesis and splicing of introns located in miRNA precursors has been reported. However, the key players of this crosstalk were unknown.

**The aim:** The main goal of the study was to identify the proteins responsible for the connection between the microprocessor and spliceosome and to characterize the detected interactions.

**Results:** The results presented in this study show that SE, a key component of the plant microprocessor, interacts directly with both subunits of AtCBC (the nuclear cap-binding complex that consists of two subunits, AtCBP20 and AtCBP80). The strongest interaction was observed when AtCBP20 and AtCBP80 interact with AtSE in a complex. Moreover, both CBC subunits bind to the full length SE protein as well as to the SE core (structured part of the protein). The identified AtCBC/SE complex serves as a molecular factor responsible for the regulation of pre-mRNA splicing and miRNA biogenesis.

In addition, during the study, direct interactions between SE and four U1 snRNP auxiliary proteins (AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b, AtLUC7rl) were detected. Two unstructured regions from the N- and C- termini of SERRATE are responsible for these interactions. The SE unstructured tails are sufficient for the binding of AtPRP40a, AtPRP40b and AtLUC7rl, while AtPRP39b requires probably the presence of the core part of SE and/or other U1 snRNP components to enable the binding of this protein. In the *se-2* Arabidopsis plants, where there is no communication between SE and its U1 snRNP partners, pri-miR1888a splicing defect and microprocessing changes were observed, as compared to the plants with active SE/U1 snRNP connection. Furthermore, the lack of SE and its U1 snRNP partners in Cajal bodies confirms that there is no direct connection between these nuclear structures and pri-miRNA maturation. The results of the study allowed to propose a model of binding of proteins involved in miRNA biogenesis to pri-miRNA. In this model SE is a platform for communication between the plant microprocessor, spliceosome and cap binding complex.