

## Streszczenie

---

SERRATE (SE) jest białkiem pierwotnie scharakteryzowanym jako czynnik bardzo ważny dla powstawania mikroRNA (miRNA) u *Arabidopsis thaliana*. Razem z białkami DCL1 i HYL1 tworzy rdzeń Mikroprocesora, kompleksu odpowiedzialnego za ten proces. W kompleksie tym SE wpływa na wydajność i precyzję wycinania miRNA przez DCL1 z pierwotnych transkryptów miRNA. Później pokazano, że SE jest zaangażowane także w inne procesy związane z metabolizmem RNA, między innymi: wycinanie intronów z pre-mRNA oraz regulację transkrypcji genów bezintronowych. W celu zrozumienia tej wielofunkcyjnej roli SERRATE przeprowadzono jego immunoprecypitację i zidentyfikowano partnerów białkowych SE z użyciem LC-MS/MS. Analiza interaktomu białkowego SE ujawniła wiele nowych partnerów białkowych. Wśród nich były wszystkie podjednostki kompleksu NEXT (ang. Nuclear Exosome Targeting): HEN2, ZCCHC8A, ZCCHC8B, RBM7. Oddziaływanie między SERRATE a kompleksem NEXT zostało potwierdzone i scharakteryzowane z użyciem trzech różnych metod: dwuhybrydowego systemu drożdżowego, techniki FRET-FLIM oraz metody *pull down*. Dodatkowa analiza wykazała, że asocjacja kompleksu NEXT z SE jest niezależna od cząsteczek RNA.

Następnie z użyciem sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq) w mutancie *hen2-2* został przeanalizowany poziom wszystkich pri-miRNA. Dane te pokazały generalną akumulację pri-miRNA w badanym mutancie. Ponadto zaobserwowano akumulację fragmentów pri-miRNA przed strukturą spinki do włosów. Obserwacje te zostały również potwierdzone innymi metodami takimi jak qRT-PCR czy 3' RACE. Analiza ta wykazała, że kompleks NEXT jest odpowiedzialny za degradację pri-miRNA oraz produktów powstających w trakcie biogenezy miRNA. Mutanty z zaburzoną biogenezą miRNA (np. *hyl-2*, *se-2*) wykazują widoczny charakterystyczny fenotyp związany z mniejszą ilością powstających cząsteczek miRNA. Analiza podwójnych mutantów, w których poza zaburzoną biogenezą miRNA była również spowolniona degradacja pri-miRNA (*hyl1-2 hen2-2*, *se-2 hen2-2*) wykazała poprawę fenotypu roślin wraz z podniesionym poziomem miRNA. Dodatkowo zaobserwowano również bardzo wysoką akumulację pri-miRNA. Dane te pokazują, że brak degradacji pri-miRNA skutkuje lepszą produkcją miRNA przez DCL1, mimo braku elementów go wspomagających.

Zaproponowany na podstawie wyników tej rozprawy doktorskiej model zakłada, że białko SERRATE jest zaangażowane w biogenezę miRNA na dwa różne sposoby. Po pierwsze pomaga białku DCL1 w wydajnym i precyzyjnym cięciu pri-miRNA, po drugie promuje degradację nadmiaru pierwotnych prekursorów miRNA przez rekrutację kompleksu NEXT.

## Abstract

---

The SERRATE (SE) protein was originally characterized as a very important factor in miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. SE, together with DCL1 and HYL1, forms the core of Microprocessor, the complex responsible for miRNA biogenesis in plants. SE influences the efficiency and accuracy of pri-miRNA cleavages catalyzed by DCL1. It was also demonstrated that SE is involved in different processes connected with RNA, e.g. splicing of pre-mRNAs and the regulation of intronless genes transcription. In order to understand this multifunctional role of SERRATE, co-immunoprecipitation experiments were carried out, and SE partners were identified using LC-MS/MS. Analysis of the SE interactome revealed many new protein partners. Among proteins co-purified with SE, all subunits of the Nuclear Exosome Targeting (NEXT) complex: HEN2, ZCCHC8A, ZCCHC8B and RBM7, were found. Using three different methods (yeast two hybrid, FRET-FLIM and pull-down assays) the interaction between SERRATE and NEXT complex was confirmed and characterized in detail. The results also showed that the SE/NEXT complex interaction is RNA-independent.

Next, using new generation RNA sequencing (RNA-seq) in the *hen2-2* mutant, the levels of pri-miRNAs were analyzed. These data showed accumulation of pri-miRNAs in the mutant tested. In addition, accumulation of pri-miRNA fragments upstream of the hairpin loop structure was also observed. This was confirmed using RT-qPCR and 3'RACE. The results obtained show that the NEXT complex is responsible for degradation of pri-miRNAs as well as 5' pri-miRNA fragments. Mutant plants with disrupted miRNA biogenesis show a characteristic phenotype connected with the lower levels of miRNAs. The analysis of double mutants in which degradation of pri-miRNA was slowed down along with the disruption of miRNA biogenesis (*hyl1-2 hen2-2*, *se-2 hen2-2*) showed an improvement in the phenotype (as compared to single mutants) together with increased levels of miRNAs. In addition, very high pri-miRNA accumulation was also observed. These data show that the lack of degradation of pri-miRNAs results in more efficient production of miRNAs by DCL1 despite the lack of supportive proteins, HYL1 and SE.

The model proposed on the basis of the results of this dissertation assumes that the SERRATE protein is involved in miRNA biogenesis in two different ways: it helps DCL1 in more efficient and accurate cleavage of pri-miRNAs and on the other hand it also promotes degradation of excess primary miRNA precursors by the recruitment of NEXT complex.