

## Streszczenie

MikroRNA są kluczowymi regulatorami ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. W przypadku roślin stwierdzono, że mikroRNA są istotne w regulacji procesów rozwojowych, jak i odpowiedzi roślin na stesy środowiskowe. Biogeneza mikroRNA jest ściśle kontrolowana zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym. Dojrzewanie pierwotnych transkryptów (zwanych pri-miRNA) niosących mikroRNA (zlokalizowane w strukturach typu spinka do włosów) obejmuje wiele dodatkowych procesów, między innymi splicing i alternatywna poliadenylacja. N<sup>6</sup>-metyloadenozyna (m<sup>6</sup>A) jest dobrze znanym modyfikowanym nukleozydem występującym w RNA, pełniącym ważną rolę w kontroli metabolizmu RNA. Katalizę powstania m<sup>6</sup>A w RNA przeprowadza enzym zwany metylazą adenozyiny mRNA (MTA, ang. mRNA adenosine methylase), a jego brak jest w roślinach embryo-letalny, co podkreśla wagę tego enzymu i modyfikacji m<sup>6</sup>A w rozwoju roślin. W przedstawionej pracy doktorskiej zająłem się odpowiedzią na pytanie, czy modyfikacja m<sup>6</sup>A jest ważna w biogenezie mikroRNA *Arabidopsis thaliana*. W badaniach wykorzystałem linię transgeniczną *A.thaliana* ze znacząco obniżonym poziomem MTA (a tym samym m<sup>6</sup>A) i odkryłem, że w porównaniu do roślin typu dzikiego w roślinach tych poziom około 25% mikroRNA jest znacząco obniżony, czemu towarzyszy akumulacja pri-miRNA. Wykorzystując technikę immunoprecypitacji i przeciwciała skierowane na m<sup>6</sup>A, a następnie wysokoprzepustowe sekwencjonowanie kwasów nukleinowych (RIP), zidentyfikowałem 11 pri-miRNA, które zawierały m<sup>6</sup>A. Następnie udowodniłem, że MTA oddziałuje z tymi pri-miRNA, tym samym pokazując, że pri-miRNA są substratami MTA. Wiadomo, że obecność m<sup>6</sup>A wpływa na strukturę RNA. Przetestowano strukturę drugorzędową pri-miRNA stosując technikę PIP-seq (ang. Protein Interaction Profile sequencing). Analiza wykazała, że zawartość struktur drugorzędowych w pri-miRNA pod nieobecność m<sup>6</sup>A znacząco maleje. Dalsze badania pokazały, że wiązanie białka HYL1 z pri-miRNA jest w mutantach *mta* również mocno zaburzone. Wynik ten można tłumaczyć zaburzeniami strukturalnymi, gdyż HYL1 wiąże się z dwuniciowym RNA. Analizując oddziaływanie MTA z innymi białkami odkryłem, że MTA oddziałuje z białkiem Tough (TGH), które odgrywa znaczącą rolę w biogenezie mikroRNA. Poza tym stwierdzono, że MTA oddziałuje z polimerazą RNA II. Dalsze analizy wykazały, że białka kompleksu Mikroprocesora (HYL1 i DCL1) kolokalizują niewydajnie w mutantach *mta* z polimerazą RNA II.

Wynik ten wskazuje, że MTA działa na wczesnych etapach biogenezy mikroRNA, najprawdopodobniej kotranskrypcyjnie.

Dodatkowo pokazałem, że zaburzona biogeneza miR393b (cząsteczki ważnej z odpowiedzi roślin na obecność auksyn) w mutancie *mta A. thaliana* zakłóca sygnalizację auksynową.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej odkryły kolejny ważny element sieci regulatorowej wczesnych etapów biogenezy mikroRNA – enzym MTA i wprowadzaną przez niego modyfikację – m<sup>6</sup>A.