

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych



Magda Rudzka

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Potranskrypcyjna regulacja ekspresji
genów związana z retencją transkryptów
na terenie jądra komórkowego*

Praca doktorska wykonana
W Zakładzie Biologii Komórki
Katedry Biologii Komórkowej i Molekularnej

Promotor pracy: dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Kołowerzo-Lubnau

Toruń 2020

PODZIĘKOWANIA

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi niniejszej rozprawy dr hab. Dariuszowi Janowi Smolińskiemu za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki, poświęcony czas, wyrozumiałość i cierpliwość.

Promotorowi pomocniczemu dr Agnieszce Kołowerzo-Lubnau za pomoc przy wykonywaniu niniejszej pracy, wsparcie i okazaną życzliwość.

Pracownikom Zakładu Biologii Komórki za miłą atmosferę pracy oraz serdeczność.

Rodzinie, Przyjaciołom, oraz Koleżankom i Kolegom doktorantom Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych za nieocenione wsparcie i wspianą atmosferę.

FINANSOWANIE

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

1. Narodowego Centrum Nauki (grant Preludium 10 2015/19/N/NZ3/02410, przyznany dla autora rozprawy; grant Sonata 11 2016/21/D/NZ3/00369, wykonawstwo autora rozprawy).
2. Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska (granty badawcze UMK dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, przyznany dla autora rozprawy w latach 2014, 2015, 2016).

PUBLIKACJE

W trakcie realizacji studiów doktoranckich opublikowano następujące prace:

Hyjek M, Wojciechowska N, **Rudzka M**, Kołowerzo-Lubnau A, Smoliński DJ (2015) Spatial regulation of cytoplasmic snRNP assembly at the cellular level. *J Exp Bot.* 2015 Dec; 66(22): 7019-30

Spis treści

	Strona
Wykaz skrótów	9
1. Streszczenie	14
2. Wstęp	18
2.1. Ekspresja genów kodujących białka	18
2.1.1. Mechanizm transkrypcji genów kodujących białka	18
2.1.1.1. Polimeraza II RNA	19
2.1.1.2. Inicjacja transkrypcji	21
2.1.1.3. Elongacja transkrypcji	23
2.1.1.4. Dołączanie czapeczki do końca 5' pre-mRNA	24
2.1.1.5. Mechanizm splicingu	26
2.1.1.6. Poliadenylacja 3' pre-mRNA	34
2.1.1.7. Terminacja transkrypcji	35
2.1.2. Eksport mRNP z jądra komórkowego do cytoplazmy	36
2.2. Główne procesy związane z regulacją ekspresji genów w komórkach eukariotycznych.....	41
2.2.1. Regulacja ekspresji genów poprzez opóźnienie eksportu do cytoplazmy- retencja na terenie jądra komórkowego	42
2.2.2. Regulacja ekspresji genów na terenie cytoplazmy	46
2.3. Mikrosporocyty modrzewia europejskiego podczas diplotenu profazy I mejozy	50
3. Cel pracy	53
4. Materiały	55
4.1. Materiał badawczy	55
4.2. Oligonukleotydy	56
4.3. Przeciwciała	59
4.4. Odczynniki	60
4.5. Roztwory, bufony i mieszaniny	62

5. Metody	64
5.1. Analizy mikroskopowe	64
5.1.1. Przygotowanie materiału do obserwacji mikroskopowych	64
5.1.2. Lokalizacje białek i RNA	65
5.1.3. Mikroskopia	68
5.1.4. Analiza obrazu	69
5.2. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym do zmierzenia poziomu ekspresji genów kodujących białka Sm.....	69
5.3. Analizy kwasów nukleinowych	73
5.3.1. Izolacja RNA do analizy transkryptomu w cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA	73
5.3.2. Frakcjonowanie i izolacja RNA do analiz transkryptomu cytoplazmatycznego	74
5.3.3. Analiza ilościowa i jakościowa kwasów nukleinowych	76
5.3.4. Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania	76
5.3.5. Sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna	79
6. Wyniki	80
6.1. Poli(A) RNA ulega retencji na terenie jądra komórkowego	80
6.2. Wzór ekspresji genów podczas cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA	84
6.3. mRNA wykazują różny czas retencji na terenie jądra komórkowego.....	90
6.4. Retencja mRNA na terenie jądra komórkowego nie prowadzi do jego degradacji	112
6.5. mRNA ulegają retencji jako pre-mRNA	117
6.6. Pre-mRNA ulegają retencji, aż do trzeciego stadium cyklu	120
7. Dyskusja	126
7.1. Retencja poli(A) RNA na terenie jądra komórkowego	126
7.2. Cykl syntezy, gromadzenia i transportu poli (A) RNA	127
7.3. Jądrowa retencja mRNA reguluje tempo eksportu i czas translacji	130

7.4. mRNA ulegają retencji w różnym stopniu dojrzałości	131
7.5. Domeny jądrowe zaangażowane w retencję mRNA	137
7.6. Retencyjne mRNA ulegają translacji po eksporcie do cytoplazmy.....	140
7.7. Perspektywy	141
8. Podsumowanie	143
Wykaz rycin i tabel.....	145
Literatura	147
Suplementy	161

WYKAZ SKRÓTÓW

AGO	<i>ARGONAUTE</i>	CHO-A	<i>Cholesterol oxidase precursor</i>
(SRP)RNA	cząsteczki rozpoznające sygnał	ChREBP	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
acBSA	acetylowana albumina wołowa	c-jun	<i>transcriptional factor</i>
ACT	aktyna	Clk	<i>cdc2-like kinase</i>
Aly	<i>Transcriptional coactivator</i>	c-myc	<i>transcriptional factor</i>
AS	alternatywny splicing	CPSF	czynnik specyficzności cięcia i poliadenylacji
ATP	adenozyno-5'-trifosforan	CRM1	eksportyna 1
BP	punkt rozgałęzienia intronu	crs1	<i>meiotic-specific cyclin</i>
BrdU	<i>5-Bromo-2'-deoxyuridine</i>	CTD	C-końcowa domena podjednostki 1 polimerazy II RNA
BRE	element rozpoznający czynnik TFIIB	CTK1	<i>non-receptor tyrosine kinase</i>
BSA	albumina wołowa	CTN-RNA	<i>cationic amino acid transporter 2 RNA</i>
BTA	podstawowy kompleks transkrypcyjny	DBP5	<i>ATP-dependent RNA helicase</i>
CB	ciało Cajala	DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
CBC	kompleks wiążący czapczkę	DI	zatrzymany intron
CDK	cyklino-zależna kinaza	DIG	digoksygenina
cDNA	<i>complementary DNA</i>	DNJ	<i>DNaJ domain protein</i>
CE	enzymy czapczkujące	DPE	element promotora
CELL2	celulaza	DSIF	<i>DRB Sensitivity Inducing Factor</i>
CF	czynnik cięcia	dsRNA	dwuniciowy RNA

DTT	ditiotreititol	Inr	element inicjatorowy
DXO	<i>family proteins are “deNADding” enzymes that remove the NAD⁺ cap from an mRNA</i>	InsP ₆	inozytol heksakifosforan
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy	IR	retencyjny intron
EEC	wczesny kompleks elongacyjny	LHCP	<i>chlorophyll a-b binding protein</i>
eF1a	czynnik elongacji translacji 1a	LSm	<i>Sm-like</i>
EF1A1	czynnik elongacyjny 1 alfa 1	LT- α	limfotoksyny- α
eIF	czynnik inicjacji translacji	MAD	<i>mouse anti-DIG IgG</i>
ER	retikulum endoplazmatyczne	mCAT2	mysi kationowy transporter aminokwasów 2
Fcp1	fosfataza Fcp1	mESC	mysie embrionalne komórki macierzyste
FG	powtórzenia fenyloalaninoglicynowe	Mex67	<i>mRNA export factor 67</i>
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja in situ	miRNA	<i>micro RNA</i>
Gemin	<i>SMN-associated proteins</i>	Mlp1	<i>Nuclear Pore-associated Protein</i>
GLE	nukleoporyna GLE	NAD7	<i>NADH dehydrogenase subunit 7</i>
GMP	guaninio monofosfataza	ncRNA	niekodujące RNA
GO	<i>Gene Ontology</i>	NELF	<i>negative elongation factor</i>
GTF	główne czynniki transkrypcyjne	Nlrp6	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 6</i>
GTP	guanino trifosfataza	NLS	sygnał lokalizacji jądrowej
HeLa	linia komórek ludzkich raka szyjki macicy	NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>	NO	szlak syntezy tlenku azotu

NPC	kompleks porów jądrowych	Pol II RNA	polimeraza II RNA
NRS	sygnał retencji jądrowej	Pol II RNA A	hipoufosforylowana polimeraza II RNA
NS	speckles	Pol II RNA O	hiperufosforylowana polimeraza II RNA
NTC	<i>no template control</i>	poli(A) RNA	poliadenylowane RNA
NUDCD2	<i>domain-containing protein 2</i>	pre-mRNA	prekursorowe RNA
Nup	nukleoporyny	Pro	prolina
NXF1/NXT1	heterodimerskie czynniki eksportu	Prp2p	<i>DEAH-box protein</i>
ORF	otwarta ramka odczytu	PTBP1	białko wiążące trakt poliprymidynowy
PABC	α -helikalna domena wiążąca peptyd	PTC	kodon wczesnej terminacji transkrypcji
PABP	białko wiążące poli(A) RNA	pz	pary zasad
Paip	białko oddziałujące z PABP	qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
PAP	polimeraza poli(A)	RBP	białko wiążące RNA
PBS	buforowana fosforanem sól fizjologiczna	rem1	<i>meiotic-specific cyclin</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	RIN	wskaźnik integralności RNA
PEP	<i>plastid-encoded plastid RNA polymerase</i>	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
PER40	peroksydaza	RNMT	metylotransferaza guaninowa
PFA	paraformaldehyd	RPB (1-12)	podjednostka polimerazy II RNA
PHAX	<i>phosphorylated adaptor for RNA export</i>	RRM	motyw rozpoznający RNA
PIC	kompleks reinicjacyjny	rRNA	rybosomalny RNA
PIPES	<i>piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) buffer</i>	RS	domena bogata w argininę i serynę

RS6	<i>40S ribosomal protein S6</i>	SSA	spliceostatyna A
RT	odwrotna transkrypcja	SSC	<i>saline-sodium citrate buffer</i>
Rtr 1	regulator transkrypcji 1	Ssu72	fosfataza Ssu72
RUST	nieproduktywny splicing i translacja	Sub2	<i>protein suppresses heterochromatic silencing at telomere</i>
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5-Acetyl transferase transcriptional co-activator complex</i>	Sus1	<i>mRNA export factor</i>
scaRNA	<i>small Cajal body RNA</i>	TAF	TATA-binding protein associated factor
SDH	dehydrogenaza bursztynianowa	TAP	<i>Transporter associated with antigen processing protein complex</i>
SEM	błąd standardowy średniej	TBA	tubulina
Ser	seryna	TBP	białko wiążące kasetę TATA
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	TEF	czynnik elongacji transkrypcji
Sm	<i>smith antigen</i>	TFII	czynnik transkrypcyjny polimerazy II RNA
SMN	<i>survival of motor neuron</i>	TGS	enzym syntetazy trimetyloguanozynowej
SNAP	białkowy kompleks inicjujący snRNA	THO	kompleks wydłużania transkrypcji
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>	Thr	treonina
snRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>	TMG	czapeczka trimetyloguanozynowa
SPN1	snurportyna 1	TSS	miejsce startu transkrypcji
SR	białko bogate w serynę i argininę	Tyr	tyrozyna
SRSF10	<i>Serine And Arginine Rich Splicing Factor10</i>	TREX	transkrypcyjny kompleks eksportu mRNA

tRNA transportowe RNA

U2AF *U2 auxiliary factor*

UAP56 *DEAD box protein*

UTR *untranslated region*

Yra1 *Yeast RNA Annealing protein*

1. STRESZCZENIE

Problem badawczy: Ekspresja genów kodujących białka w komórkach eukariotycznych jest procesem ściśle kontrolowanym na każdym z etapów, począwszy od zmian w strukturze chromatyny i interakcji między sekwencjami typu *cis*-DNA, a działaniem czynników *trans*, które są wymagane do aktywacji lub wyciszenia genów. Oprócz konstytutywnej ekspresji genów, transkrypcja określonych genów może być indukowana w odpowiedzi na etap cyklu komórkowego, jak również na bodźce, w tym stres, czy indukcję hormonalną. Regulacja ekspresji genów może wystąpić już podczas trwania procesu transkrypcji, a także procesów kotranskrypcyjnych, takich jak: 5' czapeczkowanie, splicing, czy poliadenylacja.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach dotyczą również ważnej roli regulacji procesu ekspresji w okresie potranskrypcyjnym, związanej z takimi procesami jak transport czy degradacja pre-mRNA i mRNA. Jednym z nowo odkrytych procesów regulacji potranskrypcyjnej jest retencja mRNA na terenie jądra komórkowego. Retencja mRNA koordynuje tempo eksportu mRNA na teren cytoplazmy w zależności od obecnego stanu metabolicznego i zapotrzebowania komórki. Retencji mogą ulegać zarówno w pełni dojrzałe mRNA, jak i pre-mRNA z zachowaną sekwencją intronową do czasu, aż splicing zostanie w pełni ukończony. Wydaje się, że mechanizm kontroli tempa translacji, poprzez zatrzymanie mRNA na terenie jądra, jest kluczowy w komórkach charakteryzujących się pulsacyjną aktywnością transkrypcyjną. Taka koordynacja pozwala na translację białek, zgodnie z bieżącym zapotrzebowaniem komórki, pomimo obniżenia jej aktywności transkrypcyjnej. Dotychczasowe badania nie wskazują jednak jaki mechanizm odpowiedzialny jest za retencję transkryptów u roślin nasiennych.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było zbadanie procesu retencji mRNA na terenie jądra komórkowego podczas profazy pierwszego podziału mejotycznego w mikrosporocytach modrzewia. Jest to nowy mało poznany mechanizm potranskrypcyjnej regulacji ekspresji

genów, który może związany być z: (1) przygotowaniem komórki do szybkiego uruchomienia wzmożonej aktywności metabolicznej, (2) czasowym wyciszeniem genomu, podczas którego niezbędna jest translacja określonych transkryptów kodujących białka metabolizmu podstawowego, które ulegają ekspresji we wcześniejszym okresie aktywności transkrypcyjnej.

Wyniki: Wykazano, iż w mikrosporocytach modrzewia europejskiego dochodzi do regulacji ekspresji genów, poprzez zatrzymanie na terenie jądra komórkowego mRNA, które prawdopodobnie niezbędne jest podczas kolejnych etapów rozwoju mikrosporocytów. Zidentyfikowano transkrypty, które eksportowane są na teren cytoplazmy i potencjalnie ulegają translacji. Analiza mikroskopowa wykazała, że mRNA wykazują różny czas retencji na terenie jądra komórkowego. Wykazano, że niektóre z transkryptów gromadzone były w ciałach jądrowych, takich jak ciała Cajala, czy jąderko. Okazało się, iż mRNA, które najdłużej ulegają retencji na terenie jądra komórkowego przechowywane są w formie niedojrzałej, z zachowaną sekwencją intronową. Na podstawie otrzymanych wyników wraz z dostępnymi doniesieniami literaturowymi zaproponowano, iż retencja na terenie nukleoplazmy oraz domen jądrowych mRNA oraz pre-mRNA z zachowaną sekwencją intronową stanowi nowy mechanizm potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów w komórkach roślin nasiennych o pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej.

Research problem: Expression of genes encoding proteins in eukaryotic cells is a process strictly controlled at each of the stages, ranging from changes in the structure of chromatin and the interaction between *cis*-DNA type sequences and the action of *trans* factors that are required to activate or silence genes. In addition to constitutive gene expression, transcription of specific genes can be induced in response to the cell cycle stage as well as to stimuli, including stress or hormonal induction. The regulation of gene expression may occur already during the transcription process, as well as cotranscription processes such as 5'-capping, splicing or polyadenylation.

Research conducted in recent years also relates to the important role of regulating the expression process in the post-transcriptional period, associated with such processes as transport or pre-mRNA and mRNA degradation. One of the newly discovered post-transcriptional regulation processes is mRNA retention in the cell nucleus. The retention of mRNA coordinates the rate of mRNA export to the cytoplasm depending on the current metabolic state and cell demand. Both fully mature mRNA and pre-mRNA with retained intron sequence can be retained until splicing is fully completed. The mechanism for controlling the rate of translation, by retaining mRNA in the nucleus, appears to be key in cells characterized by pulsed transcriptional activity. Such coordination allows for the translation of proteins following the current demand of the cell, despite the decrease in its transcriptional activity. However, to-date research does not indicate which mechanism is responsible for transcript retention in seed plants.

Aim of the study: This study aimed to investigate the mRNA retention process in the cell nucleus during the first meiotic division prophase in larch microsporocytes. This is a new little-known mechanism of post-transcriptional regulation of gene expression, which may be associated with: (1) preparation of the cell for rapid activation of increased metabolic activity, (2) temporary silencing of the genome, during which it is necessary to translate certain

transcripts encoding the basic metabolism proteins that undergo expression before transcriptional activity.

Results: It has been shown that in European larch microsporocytes, gene expression is regulated by retaining mRNA in the cell nucleus, which is probably necessary during the subsequent stages of microsporocyte development. Certain transcripts have been identified that are exported to the cytoplasm and potentially translated. Microscopic analysis showed that mRNAs exhibit different retention times within the nucleus. It has been shown that some of the transcripts were accumulated in nuclear bodies, such as Cajal bodies or nucleolus. It occurred that the mRNAs which retain the longest in the nucleus are stored in an immature form, with the retained introns. Based on the results obtained, together with the available literature, it was proposed that retention in the nucleoplasm and nuclear domains of mRNA and pre-mRNA with the retained introns is a new mechanism of post-transcriptional regulation of gene expression in seed plants cells with pulsatile transcriptional activity.

2. WSTĘP

2.1. Ekspresja genów kodujących białka

Ekspresja genów kodujących białka w komórkach eukariotycznych jest złożonym procesem, składającym się z wielu etapów. Pierwszym z nich jest transkrypcja przy udziale polimerazy II RNA. Podczas jej trwania, nowopowstałe pre-mRNA są poddawane procesom dojrzewania: 5` czapeczkowaniu, splicingowi i 3` poliadenylacji. Następnie transkrypty oddysocjują od miejsca transkrypcji, transportowane są na teren cytoplazmy i ulegają translacji. Każdy z etapów ekspresji genów podlega regulacji koordynowanej przez szereg ściśle określonych białek (Peck i wsp. 2019). Na każdym z etapów ekspresji możliwa jest jej regulacja, od której zależy czy i kiedy dojdzie do powstania funkcjonalnego białka.

2.1.1. Mechanizm transkrypcji genów kodujących białka

Sam przebieg procesu transkrypcji podobnie jak wszystkie etapy przetwarzania mRNA wymaga szeregu białek, które zapobiegają tworzeniu się ko-transkrypcyjnych hybryd RNA:DNA. Wpływają one na elongację transkrypcji, a także kontrolują jakość mRNA w powstających kompleksach mRNP (Hieronymus i Silver 2004).

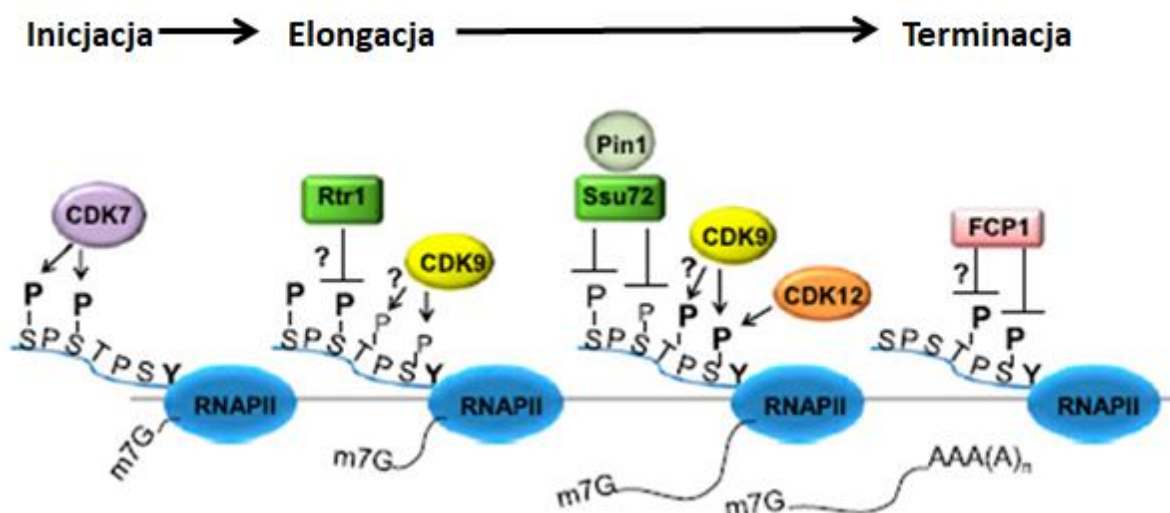
Jeszcze przed rozpoczęciem procesu transkrypcji, dochodzi do regulacji ekspresji genów poprzez modyfikacje w samej strukturze chromatyny. Zmiany w strukturze chromatyny i interakcjach pomiędzy sekwencjami *cis*-DNA, a działaniem czynników *trans* są wymagane do aktywacji lub wyciszenia genów (Struhl 1996, Schaefer i wsp. 2018). Oprócz konstytutywnej regulacji ekspresji genów, wpływ na transkrypcję określonych genów może mieć także etap cyklu komórkowego, a także stres komórkowy, czy indukcja hormonalna.

Syntezę mRNA przeprowadza wielopodjednostkowy enzym polimeraza II RNA wraz z zestawem ogólnych czynników transkrypcyjnych (GTFs) (Hahn 2004). Czynniki te biorą udział w rozpoznawaniu sekwencji promotorowych, rekrutacji polimerazy, interakcji z czynnikami regulującymi, rozwijaniu podwójnej nici DNA oraz rozpoznawaniu miejsca startu transkrypcji (TSS) (Grúnberg i Hahn 2013). Proces transkrypcji składa się z trzech etapów: inicjacji, elongacji oraz terminacji.

2.1.1.1. Polimeraza II RNA

W komórkach eukariotycznych transkrypcję genów kodujących białka, a także większości niskocząsteczkowych RNA przeprowadza polimeraza II RNA (Pol II RNA). Enzym ten jest wysoce konserwowanym ewolucyjnie i złożonym kompleksem białkowym. Składa się z dwóch dużych podjednostek (RPB1 i RPB2) i dziesięciu mniejszych (RPB3-RPB12) (Xie i Pombo 2006). Największa podjednostka (RPB1) zawiera unikalną domenę C-końcową (CTD) złożoną z tandemowo ułożonych sekwencji heptapeptydu Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (YSPTSPS), które mogą ulegać fosforylacji oraz defosforylacji. Powtórzenia te są konserwowane ewolucyjnie, jednak ich liczba jest różna u poszczególnych gatunków. Polimeraza II RNA w komórkach drożdży zawiera 26-29 powtórzeń, u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) 42 powtórzenia, u *Arabidopsis thaliana* 34 powtórzenia, natomiast u ssaków 52 (Hsin i Manley 2012, Yang i wsp. 2014). Stopień fosforylacji domeny CTD jest skorelowany z aktywnością transkrypcyjną (Bentley 2002, Zorio i Bentley 2004), a jej usunięcie powoduje zmniejszenie ogólnego poziomu transkrypcji (Zorio i Bentley 2004). Wzór modyfikacji domeny CTD podczas procesu transkrypcji jest bardzo dynamiczny i wymaga aktywności szeregu fosfataz oraz kinaz. Jedną z kinaz uczestniczących w fosforylowaniu domeny CTD jest kinaza CDK7, która jest podjednostką kompleksu kinaz związanych z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIH. Czynniki te są niezbędne podczas

aktywacji polimerazy II RNA. Podczas inicjacji transkrypcji kinaza CDK7 fosforyluje Ser5 i Ser7 (Ryc.1). Następnie, podczas elongacji kinaza CDK9 fosforyluje Ser2 i prawdopodobnie Thr4, podczas gdy grupy fosforanowe na Ser5-P i Ser7-P są stopniowo usuwane przez fosfatazy (Rtr1 i Ssu 72) (Ryc.1). Podczas dalszych etapów elongacji kinaza CDK12 prawdopodobnie również fosforyluje Ser2. Podczas terminacji transkrypcji fosfataza Fcp1 defosforyluje Ser2-P, oraz prawdopodobnie Thr4-P, dzięki czemu Pol II RNA, może być wykorzystana w kolejnej rundzie transkrypcyjnej (Ryc.1) (Hsin i Manley 2012).



Ryc. 1 Modyfikacje domeny CTD podczas cyklu transkrypcyjnego. Za (Hsin i Mantley 2012), zmienione.

Domena CTD polimerazy II RNA jest kluczowym elementem kontrolującym powstawanie prawidłowej cząsteczki mRNA, gdyż zapewnia ona „rusztowanie” dla czynników zaangażowanych we wszystkie etapy procesu transkrypcji i dojrzewania (Stiller i Hall 2002). Unikalna struktura CTD, która zawiera liczne powtórzenia heptapeptydu, zapewnia możliwość regulacji poprzez fosforylację i konformacyjną izomeryzację. Pozwala to nie tylko

modulować aktywność polimerazy, ale także rekrutować różne kompleksy wielobiałkowe zaangażowane w biosyntezę mRNA w określonych punktach cyklu transkrypcji (Belostotsky i Rose 2005). Domena CTD działa jak platforma do interakcji z różnymi czynnikami biosyntezy RNA (Greenleaf 1993), aby zlokalizować je w pobliżu transkrybowanego RNA oraz pośredniczyć pomiędzy polimerazą II RNA. Powtórzenia heptapeptydu są substratami dla kilku kinaz i fosfataz, które modyfikują reszty seryny podczas transkrypcji do interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi na różnych jej etapach (Zorio i Bentley 2004).

2.1.1.2. Inicjacja transkrypcji

Proces inicjacji transkrypcji jest ściśle kontrolowany i rozpoczyna się montażem kompleksu preinicjacyjnego, którego zadaniem jest rozpoznanie promotora i rekrutacja oraz aktywacja polimerazy II RNA. Promotory genów kodujących białka, zawierają kombinację specyficznych sekwencji DNA, rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne. W skład promotorów wchodzi zazwyczaj takie elementy jak: kasetta TATA, element inicjatorowy- Inr, element rozpoznawany przez czynnik TFIIB- BRE oraz element promotora DPE. Większość promotorów tej klasy genów zawiera jeden lub więcej z tych elementów, jednak żaden z nich nie jest absolutnie niezbędny dla funkcjonowania promotora (Hahn 2004). Kasetta TATA oraz element inicjatorowy Inr stanowią tzw. rdzeń promotora. Kasetta TATA, będąca miejscem wiązania białka TBP, jest położona najbliżej miejsca startu transkrypcji. Sekwencja inicjatorowa Inr, stanowiąca obszar otaczający miejsce startu transkrypcji, do którego wiążą się białka regulatorowe wraz z elementem DPE, odpowiedzialna jest za wiązanie białek TAF, które wchodzi w skład kompleksu jednego z ogólnych czynników transkrypcyjnych TFIID (Burke i Kadonaga 1997). Element BRE rozpoznawany jest z kolei przez czynnik

transkrypcyjny TFIIB i odpowiedzialny jest za prawidłową orientację maszynerii transkrypcyjnej na promotorze (Hahn 2004).

Inicjacja transkrypcji jest procesem wieloetapowym. U organizmów eukariotycznych polimeraza II RNA nie ma zdolności bezpośredniego wiązania z promotorem. Niezbędne jest złożenie kompleksu preinicjacyjnego (PIC), składającego się z ogólnych czynników transkrypcyjnych (GTF): TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF i TFIIH i RNAP II A (Sikorski i Buratowski 2009). Aby w pełni uformować aparat transkrypcyjny wymagane są oprócz polimerazy II RNA i GTF, jeden bądź kilka aktywatorów i mediatorów. Aktywator wiąże się do sekwencji wzmacniających promotora, natomiast mediator rekrutowany jest przez aktywator, gdyż nie ma zdolności do wiązania specyficznych sekwencji DNA. Mediator oddziałuje fizycznie z polimerazą i może być rekrutowany do promotora niezależnie od pozostałych składników maszynerii transkrypcyjnej. Mediator ma również zdolność regulowania fosforylacji domeny CTD polimerazy II RNA poprzez czynnik TFIIH (Woychik i Hampsey 2002). Podczas początkowych etapów inicjacji transkrypcji czynnik TFIID wiąże się z kasetą TATA. Kompleks TFIID zbudowany jest z białka TBP oraz około 14 czynników oddziałujących z TBP, zwanych w skrócie TAF (Struhl 1996). Do funkcji białek TAF należy między innymi rozpoznawanie sekwencji promotorowych oraz regulacja transkrypcji, gdyż wchodzi one w interakcję z aktywatorami transkrypcji i czynnikami modyfikującymi chromatynę (Lee i Young 2000). Następnie przyłączony zostaje czynnik TFIIA, który stabilizuje wiązanie czynnika TFIID z kasetą TATA. Czynnikiem niezbędnym do związania polimerazy II RNA z miejscem startu transkrypcji jest TFIIB, stanowiący rodzaj „łącznika” pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi, a enzymem. Następnie przyłącza się kompleks nieufosforylowanej polimerazy II RNA wraz z czynnikiem TFIIIF, TFIIH i TFIIE, którego przyłączenie stabilizuje trójskładnikowy kompleks DNA-TBP-TFIIB (Woychik i Hampsey 2002), tworząc tzw. podstawowy kompleks transkrypcyjny (BTA).

TFIIH jest wieloskładnikowym kompleksem białkowym i jako jedyny z ogólnych czynników transkrypcyjnych posiada aktywności kinazy i helikazy. Fosforyluje on serynę w c-końcowej domenie CTD polimerazy II RNA, prowadząc do powstania aktywnego kompleksu transkrypcyjnego i opuszczenia sekwencji promotorowych przez enzym.

2.1.1.3. Elongacja transkrypcji

Cechą charakterystyczną przejścia z etapu inicjacji do etapu elongacji cyklu transkrypcyjnego jest zmiana fosforylacji polimerazy II RNA. Przechodzi ona z formy hipofosforylowanej (Pol II A) do formy hiperfosforylowanej (Pol II O) (Xie i Pombo 2006, Washburn i Gottesman 2015, Saldi i wsp. 2016). Pierwszym etapem elongacji jest opuszczenie przez polimerazę II RNA promotora, podczas którego polimeraza przestaje być w fizycznym kontakcie z elementami sekwencji promotorowej i z częścią czynników związanych z promotorem, dzięki czemu zwiększa się jej przyczepność do powstającego RNA (Dvir 2002, Fouqueau i Werner 2017). Etap ten zakończony jest powstaniem wczesnego kompleksu elongacyjnego (EEC), kiedy RNA stabilnie zwiąże się z kompleksem transkrypcyjnym (Sounders i wsp. 2006, Fouqueau i Werner 2017). Komplex EEC podlega ciągłym kontrolom oraz modyfikacjom zanim stanie się produktywnym kompleksem elongacyjnym, procesowi temu często towarzyszy wstrzymanie procesu transkrypcji w pobliżu promotora proksymalnego, które nazywane jest drugim etapem elongacji transkrypcji (Ericson i wsp. 2018). Polimeraza II RNA zatrzymuje się w regionie 5' i działają na nią negatywne czynniki elongacji transkrypcji (DSIF i NELF) (Sounders i wsp. 2006). Jest to tzw. punkt kontrolny przed głównym etapem elongacji, aby sprawdzić czy polimeraza II RNA jest dobrze przygotowana do tego etapu, pozwala on na regulację ekspresji genów na poziomie transkrypcji (Sounders i wsp. 2006). Kolejnym etapem procesu elongacji jest wznowienie

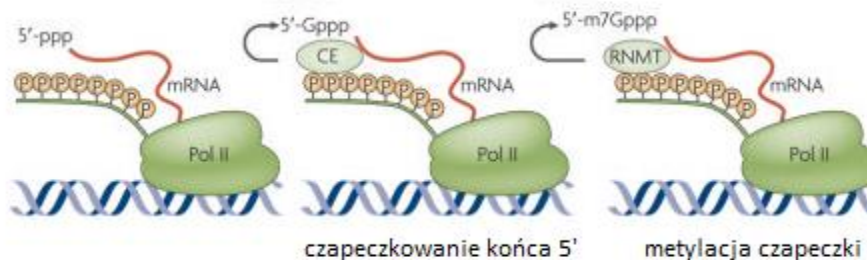
aktywności polimerazy II RNA, a w konsekwencji dalsze etapy powstawania cząsteczki RNA. Negatywne czynniki elongacji transkrypcji są odłączane od polimerazy, natomiast dołączają się pozytywne (kompleks czynnika b-P-TEFb, składający się z kinazy białkowej, kinazy CDK9 i cykliny T; TFIIS) (Price 2000). Czynniki b-P-TEFb zmienia fosforylację domeny CTD w pozycji seryny 2, co jest kluczowym elementem wznowienia aktywności polimerazy II RNA. Przyłączanie kolejnych rybonukleotydów zachodzi w kierunku 5'-3' (Brown 2001). Podczas przebiegu elongacji powstający RNA jest sparowany z DNA matrycowym w rozbudowanym heterodupleksie wielkości około 9 - 12 bp (Korzheva i Mustaev 2001). Na tym etapie dochodzi do modyfikacji powstającego transkryptu. Jedną z nich jest czapkowanie zachodzące zaraz po zapoczątkowaniu transkrypcji, czyli dołączenie czapeczki 7- metyloguaninowej do końca 5' transkryptu, które odbywa się przy udziale trzech enzymów: fosfatazy, guanylotransferazy i metylazy (Proudfoot 2000). Drugim procesem jest splicing, czyli usunięcie sekwencji intronowych z pre-mRNA. Ostatnim jest poliadenylacja końca 3', czyli przyłączenie ogona poli(A) składającego się z około 250 reszt adenozynowych. Modyfikacja ta stabilizuje cząsteczkę nowopowstałego transkryptu oraz chroni jej koniec przed atakiem rybonukleaz, a także pełni ważną rolę w procesie transportu mRNA do cytoplazmy (Romanathan i Chan 2014).

2.1.1.4. Dołączanie czapeczki do końca 5' pre-mRNA

Dołączanie czapeczki do końca 5' nowopowstałego transkryptu odbywa się na bardzo wczesnych etapach procesu transkrypcji, zwykle po transkrypcji około 20 nukleotydów RNA (Jurado i wsp. 2014). Wstrzymanie procesu transkrypcji podczas drugiego etapu elongacji ułatwia przeprowadzenie procesu czapkowania nowopowstałego transkryptu, poprzez interakcję pomiędzy pozytywnym czynnikiem elongacji transkrypcji (P-TEFb), a składnikami

aparatu czapeczkującego. Liczne badania wskazują, że jest to punkt kontrolny, który ma zapewnić, iż tylko transkrypty z prawidłowo uformowaną czapeczką na końcu 5' będą dalej transkrybowane (Pei i wsp. 2003).

Formowanie dojrzałej czapeczki wymaga trzech odrębnych reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy czapeczkujące (CE) takich jak: trifosfataza RNA, transferaza guanylowa i metylotransferaza guaninowa (RNMT) (Romanathan i Chan 2014). W pierwszym etapie trifosfataza RNA usuwa γ -fosforan z pierwszego nukleotydu pre-mRNA (5'-ppp) (Ryc. 2). Reakcję poprzedza przejście GTP w GMP, który następnie jest przenoszony przez transferazę guanylinową na pierwszy nukleotyd pre-mRNA (Ryc. 2), gdzie powstaje pomiędzy fosforanem GMP a fosforanem na końcu 5' nowopowstałego transkryptu, wiązanie 5'5'-trifosforanowe (5'-Gppp). Następnie metylotransferaza guaninowa dodaje grupę metylową do guanozyny (Ryc. 2), tworząc czapeczkę 5'-m⁷Gppp (Hirose i Manley 2000).



Ryc. 2 Proces czapeczkowania końca 5' nowopowstającego transkryptu. Za (Cole i Cowling 2008), zmienione.

Czapeczka 5'-m⁷Gppp na końcu 5' pre-mRNA odgrywa ważną rolę w koordynacji różnych procesów podczas późniejszych etapów ekspresji genów. Jest to w dużej mierze związane z

czynnikami białkowymi, które dołączane są do czapeczki w jądrze komórkowym (kompleksem wiążącym czapeczkę – CBC), jak i w cytoplazmie (czynnikami eIF4) (Romanathan i Chan 2014). Wiązanie kompleksu CBC reguluje procesy takie jak przebieg dalszych etapów procesu transkrypcji, poprzez rekrutację czynników do promotora w celu jej regulacji. CBC wpływa także na montaż spliceosomu, poprzez wiązanie z kompleksem U4/U6·U5 snRNP, dojrzewanie końca 3' pre-mRNA, poprzez wiązanie z czynnikami obróbki końca 3' pre-mRNA, wiążącymi się w miejscu poliadenylacji, oraz eksport RNA na teren cytoplazmy poprzez interakcję z jądrowymi czynnikami eksportu (Gonatopoulos-Pournatzis i Cowling 2014). Natomiast po transporcie mRNA na teren cytoplazmy do CBC rekrutowane są czynniki eIF4, które niezbędne są podczas procesu translacji (Choe i wsp. 2012). Pre-mRNA, które mają nieprawidłowo uformowaną czapeczkę, ulegają degradacji, która polega na jej usunięciu przez egzonukleazy deczapczkujące (rodzinę enzymów DXO) oraz egzonukleolitycznej degradacji (Jurado i wsp. 2014).

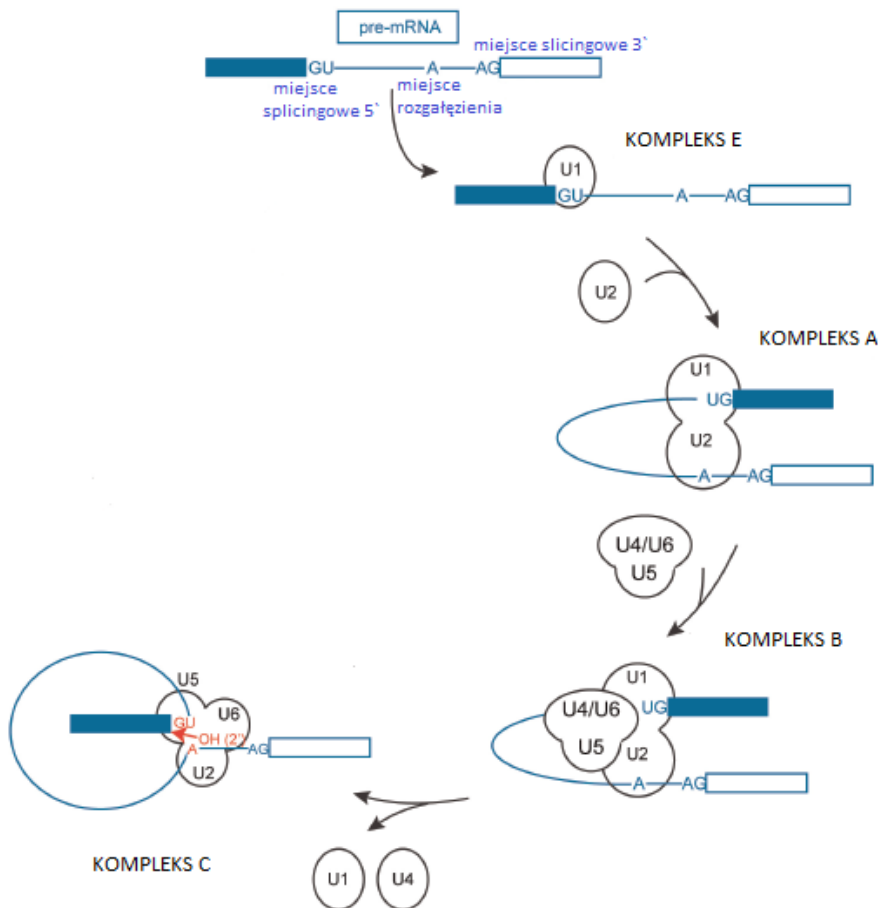
2.1.1.5. Mechanizm splicingu

Jedną z cech genów kodujących białka w komórkach eukariotycznych jest rozdzielanie sekwencji kodujących – eksonów sekwencjami niekodującymi jakimi są introny. Sekwencje niekodujące usuwane są z pierwotnego transkrypty w procesie splicingu. Proces usuwania intronów zazwyczaj odbywa się podczas transkrypcji. Przeprowadzany jest przez duży kompleks rybonukleoprotein zwany spliceosomem (Lorković i wsp. 2000). Spliceosom zawiera rdzeń, składający się z pięciu małych jądrowych rybonukleoprotein (snRNP): U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP (Šimková i Staněk 2012) oraz dużej liczby czynników białkowych. Wszystkie snRNP zbudowane są z snRNA, wspólnego zestawu białek Sm (B/B', D3, D2, D1,

E, F i G) lub LSm (U6 snRNA) oraz dużej liczby białek specyficznych dla danego snRNP (Will i Lührmann 2011).

Spliceosom funkcjonuje na drodze licznych interakcji RNA-RNA, RNA-białko oraz białko-białko, dokładnie usuwając introny oraz łącząc eksony w odpowiedniej kolejności (Hastings i Krainer 2001).

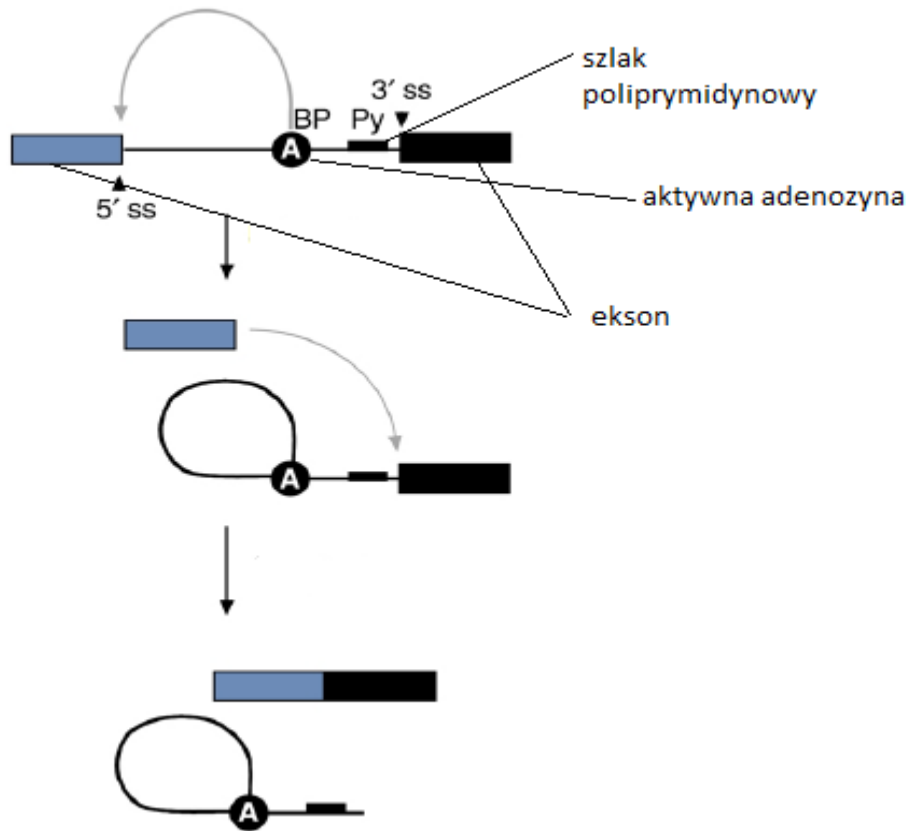
Formowanie katalitycznie aktywnego spliceosomu następuje poprzez utworzenie czterech kompleksów spliceosomalnych: E, A, B i C. Tworzenie spliceosomu (Ryc. 3) rozpoczyna się przyłączeniem U1 snRNP do pre-mRNA w miejscu splicingowym 5' intronu. Równolegle do traktu pirymidynowego (region bogaty w pirymidyny (U lub C) położony przed końcem 3' sekwencji intronowej), przyłącza się białkowy czynnik U2AF, dzięki czemu pre-mRNA może wejść w szlak splicingu (Smoliński i wsp. 2003). Następnie U2 snRNP przyłącza się do miejsca rozgałęzienia intronu, w obrębie którego znajduje się aktywna adenina (Ryc. 3). Ten ATP-zależny proces przekształca kompleks E w kompleks A, który często określan jest mianem pre-spliceosomu (Ryc. 3, Will i Lührmann 2011). W dalszym etapie do U2 snRNP przyłącza się uformowany wcześniej kompleks U4/U6·U5 snRNP tworząc kompleks B (Ryc. 3, Smoliński i wsp. 2003). Końcowym etapem jest utworzenie kompleksu C (Ryc. 3), który jest formowany poprzez remodelowanie interakcji RNA-RNA oraz RNA-białko (Hastings i Krainer 2001). Podczas tego etapu następuje także przegrupowanie całego kompleksu, w wyniku czego U6 przesuwają U1 z miejsca splicingowego 5', natomiast U6 i U2 wchodzi w interakcję, a U5 łączy miejsca splicingowe wiążąc się z końcami eksonu w 3' i 5' miejscach splicingowych (Smoliński i wsp. 2003). Następnie od kompleksu oddysocjują U1 i U4 snRNA, dzięki czemu tworzy się aktywny spliceosom i zostaje pobudzona aktywność katalityczna U2 i U6 snRNA.



Ryc. 3 Cykl tworzenia katalitycznie aktywnego spliceosomu. Za (Krummel i wsp. 2010), zmienione.

Proces splicingu odbywa się poprzez dwie reakcje transestryfikacji. Podczas pierwszej grupa 2'-OH adenozy, znajdująca się w obrębie punktu rozgałężenia intronu (BP) (Ryc. 4), atakuje wiązanie 3'5'-fosfodiesterowe w miejscu splicingowym 5'ss, co skutkuje jego rozerwaniem i uwolnieniem końca 5' intronu (Kambach i wsp. 1999). Dochodzi do przemieszczenia wiązań i wytwarza się wiązanie 2'5'-fosfodiesterowe pomiędzy grupą OH adenozy, a resztą fosforanową pierwszego nukleotydu intronu. Grupa OH ostatniego nukleotydu eksonu po zajściu pierwszej reakcji jest wolna i staje się aktywna. Natomiast intron zwija się tworząc charakterystyczną strukturę lassa (Smoliński i wsp. 2003). W drugiej

reakcji transestryfikacji wolna grupa 3'-OH eksonu 5' atakuje wiązanie fosfodiesterowe między intronem a miejscem splicingowym 3' kolejnego eksonu. Powoduje to usunięcie intronu w postaci lassa oraz połączenie dwóch sekwencji eksonu (Ryc. 4).



Ryc. 4 Mechanizm splicing. Za (Garcia-Blanco 2003), zmienione.

Opóźnienia lub błędy podczas splicingu prowadzą do powstawania defektywnych molekuł. Dlatego proces ten podlega wielu kontrolom. Pierwszymi badaniami, które wskazały na jądrową kontrolę przebiegu procesu splicingu, zostały przeprowadzone na drożdżach. Mutacja czynnika Prp2p, który bierze udział w późnych etapach aktywacji spliceosomu, powoduje zahamowanie wycinania intronów, jednak nie zapobiega montażowi spliceosomu. Eksperyment ten wskazał na wystąpienie jądrowej degradacji pre-mRNA, która zapobiega akumulacji potencjalnie toksycznych pre-mRNA (Bousquet-Antonelli i wsp. 2000).

Kanoniczne białka Sm

Białka Sm to rodzina wysoce konserwowanych ewolucyjnie krótkich polipeptydów (9-29 kDa) (Zieve i Khusial 2003). Białka z rodziny Sm można podzielić na dwie główne podrodziny: (1) kanoniczne białka Sm (zwane także rdzeniowymi) oraz białka LSm (podobne do Sm, ang. Sm-like). Każde białko tworzące kanoniczny pierścień Sm ma więc swój odpowiednik w pierścieniu LSm (Scofield i Lynch 2008). Kanoniczne białka Sm to grupa 8 niskocząsteczkowych polipeptydów: B', B, D3, D2, D1, E, F oraz G (Patel i Bellini 2008). Wszystkie poza białkami SmB i SmB' kodowane są przez oddzielne geny. Białka SmB i SmB' powstają natomiast na skutek alternatywnego splicingu pojedynczego genu i różnią się 11 aminokwasami na końcu C (Patel i Bellini 2008).

Białka z rodziny Sm posiadają wysoce konserwowane motywy Sm1 i Sm2. Badania krystalograficzne ujawniły, że motywy te układają się w przestrzenną domenę (zwaną „Sm fold” lub domenę Sm), złożoną z pięcioniciowej antyrównoległej struktury β -kartki (Kambach i wsp. 1999). Badania wykazały, że domeny te odpowiedzialne są za oddziaływanie pomiędzy poszczególnymi białkami Sm (Hermann i wsp. 1995). Kolejną cechą wspólną dla wszystkich białek z rodziny Sm jest zdolność bezpośredniej interakcji

centralnego poru pierścienia z RNA w miejscach bogatych w uracyl, zarówno w komórkach prokariotycznych (Törö i wsp. 2001), jak i eukariotycznych (Urlaub i wsp. 2001).

Białka z rodziny Sm biorą udział w niemal wszystkich najważniejszych procesach obróbki i dojrzewania RNA. Kanoniczne białka Sm są niezbędnym elementem podjednostek spliceosomalnych, biorących udział w wycinaniu intronów z pre-mRNA (Kiss 2004). Pierścień kanonicznych białek Sm stanowi rdzeniową domenę czterech z pięciu U snRNP (małych jądrowych rybonukleoprotein bogatych w urydynę) wchodzących w skład tzw. konstytutywnego spliceosomu (Matera i Wang 2014). Proces biogenezy snRNP jest złożonym wieloetapowym procesem, który przebiega zarówno na terenie jądra komórkowego jak i cytoplazmy. snRNA (U1, U2, U4 i U5) transkrybowane są przez polimerazę II RNA. Wyjątek stanowi U6 snRNA, który transkrybowany jest przez polimerazę III RNA, a jego biogeneza odbywa się tylko na terenie jądra komórkowego (Will i Lührmann 2001). Transkrypcja snRNA inicjowana jest przez białkowy kompleks inicjujący snRNA (SNAPc) (Ryc. 6, Matera i Wang 2014, Will i Lührmann 2011). Czapeczkowanie na końcu 5', jak i 3' cięcie zachodzą ko-transkrypcyjnie (Ohtani 2018). Czapeczka m¹G transkrybowanego pre-snRNA jest rozpoznawana jako pierwsza przez kompleks wiążący czapeczkę (CBC) (Izaurrealde i wsp. 1994, Pabis i wsp. 2013). Następnie wiązany jest czynnik PHAX (Ohno i wsp. 2000). W nukleoplazmie receptor eksportu CRM1 wraz z RanGTP (Patel i Bellini 2008) oddziałuje z PHAX, co powoduje translokację pre-snRNA do cytoplazmy przez kompleks poru jądrowego (Ryc. 6, Askjaer i wsp. 1999). Badania wskazują jednak, że przed eksportem do cytoplazmy pre-snRNA transportowane jest do ciał Cajala (Ryc. 6, Smith i Lawrence 2000), co wskazuje na ich rolę w formowaniu kompleksu eksportującego (Matera i Wang 2014, Lanfranco i wsp. 2017).

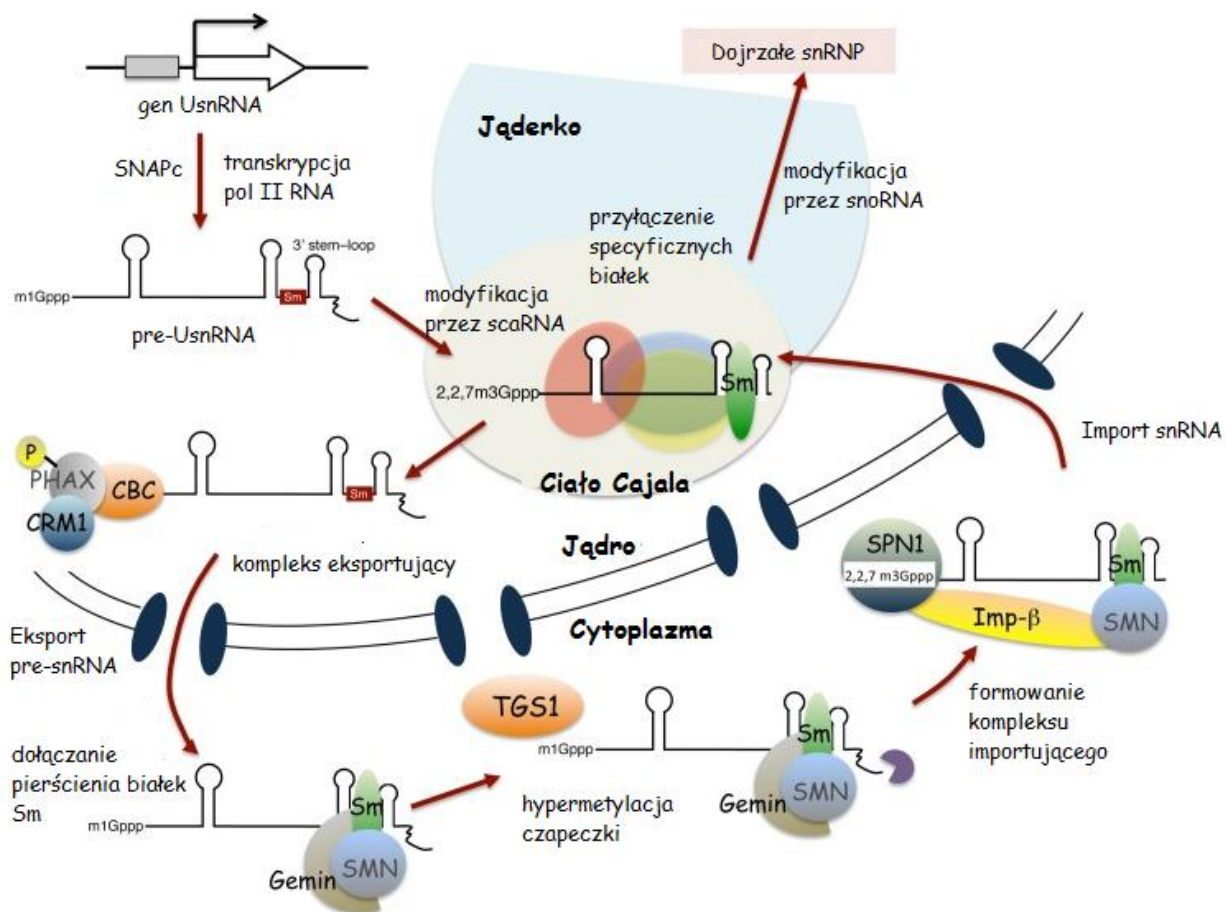
Po eksporcie do cytoplazmy czynniki eksportujące oddysocjują (Kiss 2004), następnie kompleks SMN-Gemin, który zawiera białka SMN i siedem białek Gemin (2-8) wspomagają

montaż siedmiu białek Sm do miejsca Sm (Sm-site) (Zieve i wsp. 1988). Przyłączenie pierścienia Sm jest procesem kilkietapowym. Białka Sm występują w trzech kompleksach: D1-D2, D3-B (lub D3-B') i E-F-G (Hermann i wsp. 1995, Raker i wsp. 1996, Kambach i wsp. 1999). W pierwszej kolejności powstaje pentameryczny kompleks E-G-F/D1-D2, który tworzy tzw. domenę subrdzeniową na transkrypcie U snRNA. Następnie dochodzi do przyłączenia dimeru B/B'-D3, co umożliwia zamknięcie pierścienia Sm i powstanie stabilnej domeny rdzeniowej (Ryc. 6, Fischer i wsp. 1997, Urlaub i wsp. 2001, Smoliński i wsp. 2003, Patel i Ballini 2008).

Kompleks SMN-Gemin pośredniczy także w rekrutacji enzymu syntetazy trimetyloguanozynowej (TGS), która uczestniczy w hypermetylacji czapeczki na końcu 5' snRNA w wyniku czego powstaje charakterystyczna czapeczka trimetyloguanozynowa (m^3G , TMG) (Mattaj 1986, Mouaikel i wsp. 2003), a także egzonukleolitycznego cięcia końca 3' transkryptu (Ryc. 6, Matera i Wang, 2014, Lanfranco i wsp. 2017).

Domena rdzeniowa i czapeczka m^3G uważane są za sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) (Fischer i wsp. 1993, Plessel i wsp. 1994). Sygnał ten jest rozpoznawany specyficznie przez receptor importynę β oraz snurportynę 1 (SPN1) (Ryc. 6). Po reimportacji do jądra komórkowego, UsnRNP gromadzą się ponownie w ciałach Cajala (CB), gdzie podlegają ostatnim etapom dojrzewania takim jak metylacja i pseudourydylacja przez scaRNA (Jády i Kiss 2001, Darzacq i wsp. 2002). Następnie do snRNA przyłączają się specyficzne białka dla każdego U snRNA. Dojrzałe już snRNP gromadzone są w skupiskach ziarnistości interchromatynowych nazywanych speckles występujących blisko aktywnych transkrypcyjnie genów. Dzięki tej bliskości mogą dostarczyć bardzo szybko U snRNP do miejsc transkrypcji (Kiss 2004) (Ryc. 6).

W przypadku biogenezy U6 snRNA, pre-snRNA lokalizowane są na terenie jąderka, gdzie poprzez snoRNA (małe jąderkowe RNA) ulegają ostatnim etapom dojrzewania (Ryc. 6, Ohtani 2018).



Ryc. 5 Model biogenezy snRNA w komórkach ssaków. Za (Ohtani 2018), zmienione.

2.1.1.6. Poliadenylacja 3' pre-mRNA

Ostatnim etapem dojrzewania pre-mRNA jest poliadenylacja końca 3', która odbywa się przed zakończeniem procesu transkrypcji. Zachodzi ona w dwóch etapach: (1) endonukleolityczne rozcięcie prekursorowej cząsteczki mRNA, (2) dodanie na końcu 3' końca poli(A).

Rozcięcie pre-mRNA wymaga wielu białek: czynnika specyficzności cięcia i poliadenylacji (CPSF), czynnika stymulacji cięcia (CstF), dwóch czynników cięcia (CFI i CFII), polimerazy poli(A) (PAP), która dodaje adenozyny do wolnej grupy 3'-OH po rozcięciu prekursorowej cząsteczki mRNA (Hocine i wsp. 2010). Poliadenylacja rozpoczyna się po zsyntetyzowaniu w pre-mRNA sekwencji AAUAAA i sekwencji bogatej w GU. Do sekwencji AAUAAA przyłącza się czynnik CPSF oraz PAP. CstF poprzez swoją małą podjednostkę wiąże się natomiast z sekwencją GU na pre-mRNA (Hirose i Manely 2000). Następnie czynniki cięcia CFI i CFII łączą się z CstF i PAP. Specyficzna endonukleaza rozcina pre-mRNA za sekwencją AAUAA, a polimeraza poli(A) dodaje do nowopowstałego końca 3' kolejne adeniny, budując ogon poli(A) (Hollerer i wsp 2013). Prawidłowy przebieg poliadenylacji nowopowstałego transkryptu jest niezwykle ważny podczas eksportu dojrzałego mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, a także stabilizacji mRNA, czy procesu translacji (Jurado i wsp. 2014). Jednym z koordynatorów prawidłowego przebiegu procesu poliadenylacji jest białko wiążące poli(A) (PABP), które dołączane jest do powstającego ogona poli(A) (Qu i wsp. 2009, Mangus i wsp. 2003, Hocine i wsp. 2010). Białko PABP składa się z czterech motywów rozpoznających RNA (RRM: RRM1, 2, 3 i 4) oraz części C-końcowej zawierającej α -helikalną domenę wiążącą peptyd (PABC). Dwa n-końcowe motywy RRM (RRM1-2) wiążą poli(A) RNA oraz eIF4G. Ponadto PABP zawiera miejsca wiązania innych cząsteczek ważnych dla translacji i metabolizmu RNA i białek. Paip 2 (białko oddziałujące z PABP)

może wiązać się z RRM2-3 w PABP, zamiast poli(A) RNA i eIF4G, powodując hamowanie translacji (Machida i wsp. 2018).

2.1.1.7. Terminacja transkrypcji

Prawidłowy przebieg terminacji transkrypcji ma kluczowe znaczenie dla uwolnienia polimerazy II RNA, a także zapobiega tworzeniu anty-sensownych RNA, które mogą zakłócać transkrypcję prawidłowych mRNA (Richard i Manley 2009). Sygnałem niezbędnym do rozpoczęcia terminacji transkrypcji genów kodujących białka jest poliadenylacja końca 3' nowopowstałego transkrypty (Eaton i West 2018). Istnieją dwa modele wyjaśniające przebieg procesu terminacji transkrypcji: (1) model allosteryczny (anty-terminatorowy), (2) model torpedy. Model allosteryczny zakłada, iż poprzez wytworzenie końca poli(A) na nowo zsyntetyzowanym RNA dochodzi do zmian konformacyjnych w kompleksie elongacyjnym, poprzez dysocjację czynników elongacyjnych i/lub asocjację czynników terminacji transkrypcji (Hirose i Manley 2000). Natomiast model torpedy zakłada działanie egzonukleazy trawiącej 3' produkt cięcia. Cięcie transkrypty w obrębie dinukleotydu CA jest zasygnalizowane polimerazie przez działanie 5'-3'egzonukleazy, która szybko degradowuje produkt 3' cięcia. Dzięki temu polimeraza łatwiej oddysocjowuje od matrycy DNA. Miejsce terminacji może ulec przesunięciu w wyniku zmiany ilości reszt w miejscu terminacji, a także w wyniku mutacji w miejscu cięcia lub w miejscu sekwencji sygnałnej poli(A) (Yonaha i Proudfoot 2000). Domena CTD polimerazy II RNA ulega stopniowej defosforylacji w pozycji Ser2-P, dzięki czemu może być wykorzystana w kolejnej rundzie transkrypcyjnej (Hsin i Manley 2012).

2.1.2. Eksport mRNA z jądra do cytoplazmy

Przygotowanie mRNA do eksportu jest wysoce skoordynowanym procesem. Rozpoczyna się już po dołączeniu czapeczki, kiedy transkrypt ma 25-30 nt i kończy się asocjacją i dysocjacją białek do mRNA formując wraz z nim kompleksy rybonukleoproteinowe (mRNP), które są zdolne do transportu na teren cytoplazmy (Stewart 2010, Azimi i wsp. 2014). Tylko poprawne przeprowadzenie jądrowej biosyntezy mRNA i rekrutacja czynników eksportowych skutkuje jego transportem do cytoplazmy. Jeśli jednak transkrypcja nie jest poprawnie przeprowadzona, mRNA może zostać rozpoznane przez jądrową maszynię sprawdzającą jakość mRNA i zatrzymane w jądrze komórkowym, usunięte przez jądrowy egzosom, lub wprowadzone na szlak NMD (Carmody i Went 2009).

Każde z mRNA posiada pięć miejsc do których mogą przyłączyć się specyficzne białka dla tego regionu: czapeczka na 5' końcu, 5' UTR, otwarta ramka odczytu (ORF), 3' UTR, ogon poli(A) (Rissland 2017). Niektóre RNP podlegają dynamicznej wymianie bezpośrednio przed transportem przez kompleksy porów jądrowych (NPC), podczas gdy inne pozostają trwale związane z mRNA, aż do związania z rybosomami, zanim zostaną ponownie importowane na teren jądra komórkowego. Powszechnie uważa się, że maszyna eksportowa rozpoznaje sygnały w obrębie kompleksów białkowych, a nie w samym mRNA (Iglasias i Stutz 2008). Niezwykle ważną rolę odgrywa transkrypcyjny kompleks eksportu mRNA (TREX), transportowany przez maszynę splicingową. Po dojrzewaniu mRNP pośredniczy on wraz z czynnikami splicingowymi SR w rekrutacji heterodimerycznych czynników eksportu NXF1/NXT1 za pośrednictwem kompleksu białek rdzeniowych określanych jako kompleks wydłużania transkrypcji (THO). TREX jest wysoce konserwowanym kompleksem, który występuje zarówno u drożdży, jak i u kręgowców. U ludzi złożony jest z białek UAP56 i Aly (u drożdży Sub2 i Yra1), jak również zasocjowany jest z wielopodjednostkowym

kompleksem THO (Masuda i wsp. 2005). W komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* kompleks THO wiąże się z powstającym mRNA podczas transkrypcji i uczestniczy zarówno w elongacji transkrypcji, jak i eksporcie mRNA. Mutacja w jednym z komponentów kompleksu THO powoduje nieefektywny przebieg elongacji i eksportu oraz zatrzymanie transkryptów w skupiskach, które znajdują się w pobliżu miejsc ich transkrypcji (Strasser i wsp. 2002). Kompleks TREX u drożdży związany jest z elongacją transkrypcji, eksportem mRNA, jak i tworzeniem końca 3' pre-mRNA. Wykorzystanie w badaniach mutantów kompleksu TREX, wykazało iż indukują one defekty w elongacji i zatrzymanie polimerazy II RNA w pobliżu końca 3'. Mutacje te zapobiegają rearanżacji mRNP, powodując dysocjację czynników poliadenylacji, hamując tym samym poliadenylację i uwalnianie mRNA z miejsca transkrypcji (Saguez i wsp. 2008).

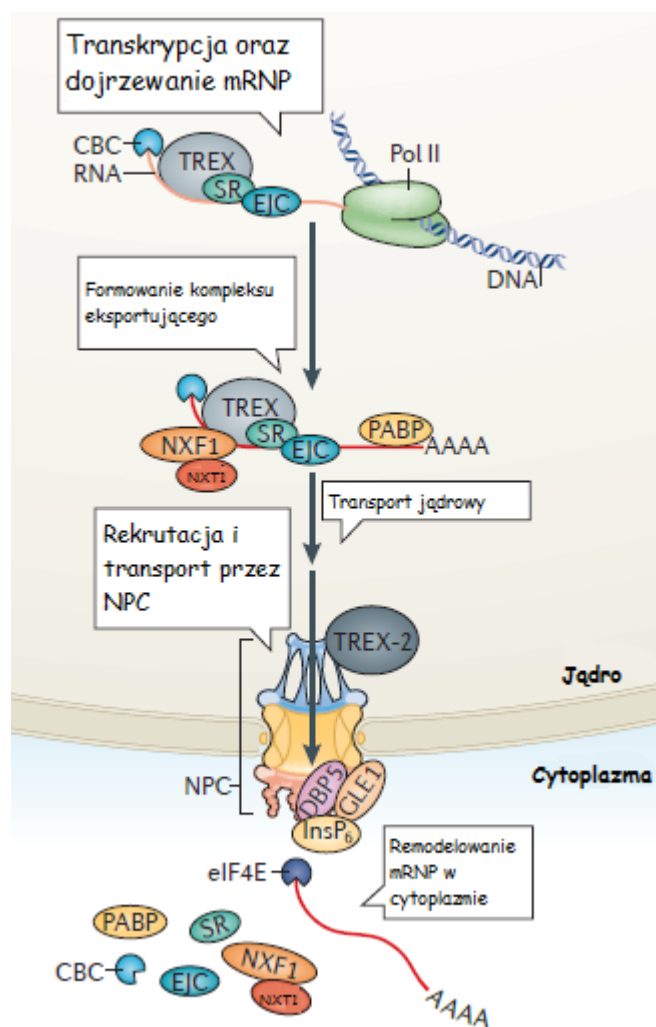
Badania przeprowadzone przez Cheng i wsp. (2006) na komórkach ludzkich wskazują, iż w komórkach eukariotycznych kompleks TREX dołączany jest do nowopowstającego transkryptu blisko końca 5', co może wskazywać na rolę czapeczki w rekrutacji kompleksu transkryptów ulegających splicingowi. Usunięcie czapeczki z pre-mRNA powoduje brak asocjacji niektórych z elementów kompleksu TREX, a także zatrzymanie eksportu do cytoplazmy (Cheng i wsp. 2006). Kompleks TREX podczas eksportu mRNP na teren cytoplazmy związany jest z receptorem eksportu jądrowego u drożdży Mex67/TAP, który przenosi kompetentne cząsteczki mRNP z jądra przez bezpośrednią interakcję z nukleoporynami w NPC. Ze względu na niskie powinowactwo wiązania mRNA, Mex67/TAP wymaga białek adaptorowych do połączenia z dojrzałymi transkryptami gotowymi do eksportu.

Po biosyntezie mRNA i asocjacji z NXF1/NXT1, komponenty THO/TREX są usuwane z mRNP (Ryc. 6, Natalizio i Wente 2013) i może być ono eksportowane do cytoplazmy. Następnie mRNP jest rekrutowany do kompleksu poru jądrowego (NPC).

NPC jest dużym, wieloskładnikowym kompleksem o wielkości około 100 MDa u kręgowców składającym się z około 30 różnych białek, zwanych nukleoporynami (Nup) (Wente i Rout 2010). Nukleoporyny w NPC posiadają powtórzenia fenyloalanino-glicynowe (FG), które są miejscami przyłączenia dla receptorów transportowych. Peryferycznie zlokalizowane nukleoporyny oddziałują z rdzeniem poru jądrowego formując pierścień zarówno po stronie jądrowej, cytoplazmatycznej, jak i w otoczce jądrowej (Wente i Rout 2010). Po stronie jądrowej Nup tworzą włókna, które łączą się w tzw. koszyczek jądrowy. Natomiast po stronie cytoplazmatycznej włókna nie tworzą żadnej struktury, ale wolno zawieszono są w cytoplazmie (Wente i Rout 2010).

Po rekrutacji mRNP do NPC, mRNP transportowane jest do cytoplazmy, dzięki związaniu się NXF1/NXT1 z powtórzeniami FG nukleoporyn (Ryc. 5, Azimi i wsp. 2014). Po przejściu na teren cytoplazmy NXF1/NXT1 związane z mRNP oddziałuje z ATP-zależną helikazą RNA DBP5, która katalizuje oddysocjowanie białek związanych z mRNA. Proces ten regulowany jest przez nukleoporynę GLE1, inozytol heksakifosforan InsP_6 i cytoplazmatyczny kompleks białek poru jądrowego (NUP214) (Ryc. 5, Wickramasinghe i Laskey 2015). Ta przestrzenna regulacja aktywności zapobiega ponownemu re-importowi mRNP do jądra komórkowego, a tym samym zapewnia kierunkowość eksportu mRNA (Lin i wsp. 2018). Czynniki eksportu NXF1/NXT1 są re-importowane do jądra komórkowego za pomocą białek jądrowej maszynierii importującej (Stewart 2010). Po eksporcie mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, do czapeczki wiąże się kompleks eIF4F (Ryc. 5), zawierający czynnik inicjacji translacji eIF4E, helikazę RNA eIF4A oraz białko rusztowania eIF4G. W kolejnym etapie tworzony jest kompleks preinicjacyjny 43S (zawierający małą podjednostkę rybosomową i kolejne czynniki inicjacji translacji), rekrutowany do mRNA poprzez interakcję między eIF3 i eIF4F. Kompleks preinicjacyjny skanuje 5' UTR transkryptu i po odnalezieniu kodonu start

translacji stymuluje przyłączenie dużej podjednostki rybosomowej, a w konsekwencji utworzenie pełnego rybosomu (Weill i wsp. 2012) i translację.



Ryc. 6 Etapy eksportu mRNA na teren cytoplazmy. Za (Wickramasinghe i Laskey 2015),
zmienione

Przeprowadzone badania wykazały wiele mechanizmów, które koordynują proces transportu mRNP do cytoplazmy. Jednym z procesów, który ma znaczący wpływ na eksport mRNA jest splicing. Może on wzmocnić rekrutację czynników eksportowych, co skutkuje wzrostem eksportu mRNA na teren cytoplazmy (Cullen 2003). Stanowi to kolejny czynnik wpływający na efektywność eksportu mRNP. Badania przeprowadzone na ekstrakcie jąder komórkowych *Xenopus laevis*, w których przeprowadzano splicing *in vitro* wykazywały, iż mRNP które ulegały splicingowi były bardziej wydajnie eksportowane niż mRNP, które nie zawierały czynników splicingowych (Luo i Reed 1999). Splicing nie jest jednym z wymogów dla eksportu mRNP, ale podczas jego trwania, dołączane są czynniki eksportu, które go ułatwiają i wpływają na jego tempo (Cullen 2003).

Badania przeprowadzone przez Lund i Guthrie (2005) wykazały, że ATP-zależna helikaza RNA DBP5 promuje dysocjację receptora eksportowego Mex67 od mRNP na pierścieniu jądrowym. Mutacje powstające w DBP5 powodują zwiększoną siłę wiązania Mex67 z poliadenylowanymi mRNP, co skutkuje defektywną dysocjacją do mRNP (Lund i Guthrie 2005). Chociaż uważa się, że DBP5 promuje przede wszystkim eksport w połączeniu z włóknami cytoplazmatycznymi NPC, w mutantach DBP5, poli(A) RNA akumuluje się w jądrze i koncentruje się w kilku jądrowych skupiskach (Lund i Guthrie 2005).

Liczne doniesienia wskazują, iż w proces regulacji eksportu mRNA zaangażowany jest także sam kompleks poru jądrowego. Wykazano, iż locus genu galaktokinazy może być związany z otoczką jądrową w pączkujących drożdżach, w celu zainicjowania procesu transkrypcji (Taddei 2007) lub do koordynacji procesu transkrypcji i eksportu (Iglesias i Stutz 2008). Identyfikacja białka Sus1 u drożdży, które jest częścią dwóch kompleksów: kompleksu transkrypcyjnego SAGA i kompleksu eksportowego związanego z NPC TREX-2 zasugerowało fizyczne sprzężenie aktywowanych genów ze stroną jądrową NPC (Rodriguez-

Navarro i wsp. 2004). Podobnie, nukleoporyny (Nups) okazały się wiązać i zmieniać konformację chromatyny (Ishii i wsp. 2002).

2.2. Główne procesy związane z regulacją ekspresji genów w komórkach eukariotycznych

W komórkach eukariotycznych ekspresja genów kodujących białka jest ściśle kontrolowana na każdym z etapów, począwszy od aktywacji genu do powstania prawidłowego mRNA, który zostanie przetransportowany na teren cytoplazmy, aby ulec translacji. Komórki eukariotyczne zawierają szeroki zakres regulacji ekspresji genów, od zmian w konformacji chromatyny, aktywacji genu w odpowiedzi na stan metaboliczny lub bodziec zewnętrzny, a także regulacji podczas procesu transkrypcji (Doma i Parker 2007, Houseley i Tollervey 2009). W ostatnich latach coraz więcej badań koncentruje się na kluczowej roli regulacji ekspresji genów, która zawiera precyzyjne mechanizmy koordynujące syntezę produktu końcowego w zależności od obecnego stanu metabolicznego i zapotrzebowania komórki.

Mechanizmy regulacji ekspresji genów odpowiedzialne są za utrzymanie dynamicznej równowagi pomiędzy transkrypcją *de novo* transkryptu, a translacją białka. Kontrola ekspresji genów może zachodzić zarówno na terenie jądra komórkowego, ale także na terenie cytoplazmy.

Aby zapewnić prawidłowy przebieg ekspresji genów, w komórkach wykształciło się kilka mechanizmów zapobiegających przedwczesnemu uwalnianiu nieprawidłowych lub niedojrzałych pre-mRNA lub mRNA do cytoplazmy. Ich transport oraz translacja spowodowałoby powstanie niefunkcjonalnych i wadliwych białek, powodując stres lub śmierć komórki.

Jednym z nich jest występowanie rdzeniowych czynników splicingowych tylko na terenie jądra komórkowego oraz zablokowanie ich transportu do cytoplazmy. Wiele białek dołączając do mRNP sygnalizuje prawidłowe zakończenie etapów przetwarzania, dzięki czemu możliwe jest rozróżnienie między prawidłowymi i nieprawidłowymi RNA. Kolejnym z mechanizmów jest koordynacja procesu splicingu z eksportem mRNA, dzięki czemu czynniki eksportu są rekrutowane tylko do mRNA, które zakończyły już splicing. Kompetentne do eksportu mRNP są kontrolowane w porach jądrowych, a wadliwe mRNP są zatrzymywane na terenie jądra komórkowego. Nieprawidłowe mRNA są rozpoznawane i degradowane na drodze NMD (Wegener i Müller- McNicoll 2017).

2.2.1. Regulacja ekspresji genów poprzez opóźnienie eksportu do cytoplazmy- retencja na terenie jądra komórkowego

Przeprowadzone badania wskazują jednak, iż oprócz kontroli jakości mRNA, która od razu prowadzi do degradacji nieprawidłowego transkrypty, istnieją także mechanizmy pozwalające na czasową retencję mRNA i późniejszą jego degradację. Badania przeprowadzone na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, iż nieprawidłowe mRNA mogą ulegać retencji: (i) w miejscu transkrypcji podczas inicjacji lub elongacji, (ii) gdy splicing jest nieprawidłowo przeprowadzony, (iii) w NPC (Liu i wsp. 2014).

Legrain i Rosbash wykazali, iż u drożdży intron, który nie uległ splicingowi, ale był rozpoznany na wczesnym etapie przez spliceosom powoduje retencję takiego transkrypty na terenie jądra komórkowego, a później jego degradację (Legrain i Rosbash 1989). Podobny mechanizm zatrzymania pre-mRNA z intronem w miejscu transkrypcji wykazano u ssaków. Badania przeprowadzone z użyciem genów reporterowych wykazały, iż transkrypty z zachowanym jednym intronem pozostawały w miejscu transkrypcji, a polimeraza II RNA

była zatrzymywana na 3' końcu transkryptu. Nieprawidłowe dojrzewanie 3' końca transkryptu prowadziło do degradacji takiego transkryptu przez jądrowy egzozom (Almeida i wsp. 2010).

Retencja transkryptu w kompleksie poru jądrowego związana jest z rekrutacją endorybonukleazy Swt1p, która przejściowo łączy się z NPC, aby zainicjować degradację transkryptu, zapobiegając jego eksportowi (Skruzny i wsp. 2009). Czasowa retencja na terenie jądra i późniejsza jego degradacja może zapobiegać syntezie defektywnych białek.

W ostatnich latach wykazano jednak, iż retencja mRNA na terenie jądra komórkowego nie musi prowadzić do jego degradacji. W wielu typach komórek zaobserwowano, że znaczna część poliadenylowanych transkryptów (około 30%) zostaje zatrzymana na terenie jądra komórkowego, nie ulega degradacji, a także nie jest wykrywana na terenie cytoplazmy (Herman i wsp. 1976). Obecnie wiadomo, że niektóre z tych transkryptów stanowią długie niekodujące RNA (lncRNA) - podobne do mRNA - które podobnie jak mRNA ulegają splicingowi, poliadenylacji, posiadają czapkę na końcu 5' i pełnią różne funkcje regulatorowe (np. transkrypcyjnej, czy translacyjnej regulacji ekspresji genów). Drugą grupę stanowią niekodujące RNA (ncRNA) do których należą m.in. cząsteczki rozpoznające sygnał (SRP)RNA, jądrowe snRNA, jąderkowe snoRNA, miRNA, a także rybosomalne, czy transferowe RNA (Inagaki i wsp. 2005). Badania wskazują, iż ncRNA odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów m.in. poprzez epigenetyczne modyfikacje chromatyny, wpływając na spadek lub wzrost aktywności transkrypcyjnej, poprzez zmiany w strukturze chromosomów.

Zjawiskiem dość powszechnym jest akumulacja tzw. długowiecznego mRNA w cytoplazmie komórek, w których została wyciszona aktywność transkrypcyjna, tj. oocytach (Picton i wsp. 1998), czy cytoplazmie dojrzałych ziaren pyłkowych (Tuppy 1982, Zienkiewicz i wsp. 2006),

które przechowywane jest do dalszych etapów rozwoju tych komórek. Sugeruje to, że te mRNA nie ulegają natychmiastowej translacji po syntezie, ale są akumulowane i translatowane w konkretnym etapie życia komórki.

Badania wskazują, iż na terenie jądra komórkowego istnieją podobne mechanizmy regulacji ekspresji genów, polegające na zatrzymaniu mRNA. Doniesienia dotyczące zarówno zwierząt, jak i roślin, ujawniają, że również transkrypty kodujące białka mogą być zatrzymywane w jądrze komórkowym (Averbeck i wsp. 2005, Boothby i wsp. 2013, Halpern i wsp. 2015). Ponieważ pre-mRNA jest poddawane modyfikacjom jeszcze w trakcie trwania syntezy RNA, w pełni dojrzałe mRNA może powstać w stosunkowo krótkim czasie. Zatem ten długi okres retencji jądrowej wskazuje, że najprawdopodobniej jądro pełni dodatkową wcześniej pomijaną rolę. Jądrowa retencja mRNA może być związana z bodźcami zewnętrznymi, działającymi na komórkę. Badania przeprowadzone na *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* ujawniły, iż po stresie cieplnym dochodzi do akumulacji poli(A) RNA na terenie jądra komórkowego, podczas gdy mRNA kodujące białka odpowiedzi na stres cieplny były eksportowane do cytoplazmy (Cole i Saavedra 1997).

Badania jądrowej retencji mRNA sugerują, że mechanizm ten jest także obecny w komórkach nie poddawanych stresowi. Najnowsze badania przeprowadzone na komórkach linii generatywnej- mikrosporocytach modrzewia oraz komórkach somatycznych- komórkach merystematycznych *Allium cepa*, *Lupinus luteus* i *Arabidopsis thaliana* (Kołowerzo i wsp. 2009, Niedojadło i wsp. 2014) wykazały, iż ilość poli(A) RNA na terenie jądra znacznie przewyższa jego ilość na terenie cytoplazmy. Wskazuje to na znaczącą rolę regulacji ekspresji genów poprzez opóźnienie eksportu, a także prawdopodobnie translacji, co umożliwia syntezę określonych białek związanych z różnymi procesami komórkowymi (Brandt i wsp. 2006, Grosskortenhause i wsp. 2006).

Badania przeprowadzone na ludzkich fibroblastach, w których wykrywano inkorporowane *in vivo* BrUTP, aby zlokalizować nowo zsyntetyzowane transkrypty wraz z lokalizacją poli(A) RNA wykazały niską kolokalizację tych dwóch cząsteczek (Fay i wsp. 1997). Otrzymane wyniki wskazują, iż poli(A) RNA obecne w jądrze komórkowym prawdopodobnie pochodzi z poprzedniej rundy transkrypcji i zostało zatrzymane na terenie jądra komórkowego. Badania przeprowadzone przez Susor i wsp. (2015a, b) na oocytach ssaków wykazały, że po okresie wysokiej aktywności transkrypcyjnej podczas wzrostu, jądro (pęcherzyk zarodkowy, GV) staje się transkrypcyjnie nieaktywne. Oocyty wykorzystują tylko transkrypty syntezowane i przechowywane w jądrze podczas wczesnych etapów rozwoju. Ekspresja tych transkryptów jest regulowana potranskrypcyjnie i ich translacja jest czasowo regulowana (Susor i wsp. 2015a, b).

W mikrosporach paproci *Marsilea vestita* podczas różnicowania spermatyd został zaobserwowany podobny mechanizm regulacji ekspresji genów. W komórkach, które są wyciszone transkrypcyjnie, nadal dochodzi do syntezy białek. Komórki wykorzystują mRNA, które zostało zsyntetyzowane we wcześniejszych etapach rozwoju. Badania wskazują także, że niektóre transkrypty ulegają translacji w ściśle określonych stadiach rozwoju spermatyd. Białka, których nie obserwowano we wczesnych stadiach, obserwuje się w późniejszych, pomimo wyciszenia transkrypcji. W badaniach tych wykazano, iż mRNA, które ulega retencji na terenie jądra komórkowego zawiera introny. Retencja i późniejsze usuwanie intronów z pre-mRNA reguluje translację podczas szybkiej, kontrolowanej potranskrypcyjnie spermatogenezy u tego gatunku (Boothby i wsp. 2013). Analiza transkryptomu ujawniła dużą grupę transkryptów z retencyjnymi intronami, które kodują białka niezbędne do rozwoju gamet. Wskazuje to, iż u paproci dochodzi do ściśle kontrolowanej potranskrypcyjnej regulacji spermatogenezy u tego gatunku, poprzez retencję transkryptów mRNA zawierających introny (Boothby i wsp. 2013).

Podobny mechanizm regulacji ekspresji genów zaobserwowano również w dzielących się mejotycznie komórkach drożdży (Averbeck i wsp. 2005) oraz zarodkach kurzych podczas gastrulacji (Mensilla i wsp. 2005).

Retencja mRNA na terenie jądra komórkowego prawdopodobnie zapobiega przedwczesnej translacji transkryptów, które kodują białka niezbędne komórkom somatycznym w kolejnych etapach cyklu komórkowego, oraz komórkom generatywnym, w różnych etapach rozwoju. Jądrowa retencja mRNA kodującego białka jest kolejnym mechanizmem potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Mechanizm ten umożliwia koordynację złożonych procesów, które wpływają na ekspresję genów kodujących białka, a zatem wpływają na poziom syntezy poszczególnych białek, które są niezbędne podczas aktualnego stanu metabolicznego i zapotrzebowania komórki. Niemniej jednak mechanizm odpowiedzialny za jądrową retencję mRNA u roślin nasiennych pozostaje słabo poznany.

2.2.2. Regulacja ekspresji genów na terenie cytoplazmy

Cytoplazma poprzez swoją złożoność, funkcjonuje jako centrum koordynacji równowagi między procesami, których rezultat stanowi ekspresja genu na pożądanym poziomie, w zależności od aktualnego stanu metabolicznego i zapotrzebowania komórki. Jednym z najistotniejszych procesów kontroli jakości RNA na terenie cytoplazmy jest NMD, który rozpoznaje i degraduje cząsteczki mRNA zawierające przedwczesny, nonsensowny kodon powodujący zbyt wczesną terminację translacji (PTC). Usuwanie mRNA zawierających PTC zapobiega powstawaniu skróconych form białek, potencjalnie szkodliwych dla komórki. Intensywne badania ostatnich lat wykazały, że kontroli NMD podlegają nie tylko wadliwe transkrypty, ale i te prawidłowe o funkcji fizjologicznej. Kontroli podlegają m.in. transkrypty wpływające na różnicowanie komórek, odpowiedzi na stres czy rozwoju choroby (Nickless i

wsp. 2017). Istnieje wiele mechanizmów, które mogą prowadzić do PTC w prawidłowych transkryptach. Jednym z nich jest alternatywny splicing, który powoduje powstanie szeregu izoform mRNA, ale może także prowadzić do powstania PTC i skierować transkrypt na drogę NMD. Na przykład białko wiążące trakt poliprymidynowy (PTBP1) może represjonować splicing 11 intronu własnego mRNA, prowadząc do degradacji na drodze NMD. PTBP1 negatywnie reguluje własną ekspresję. Rodzina białek bogata w argininę i serynę (SR), również regulowana jest przez alternatywny splicing związany z NMD. Jest to tak zwany nieproduktywny splicing i translacja (RUST), które są mechanizmem kontrolującym poziom czynników splicingowych i innych białek wiążących RNA (Ni i wsp. 2004).

Kodon stop, który jest powodem degradacji na drodze NMD, może również tworzyć się jeśli główny region kodujący mRNA poprzedzony jest przez otwartą ramkę odczytu (ORF). Analiza transkryptomyczna wykazała, że długie regiony 3' UTR są jednym z przyczyn NMD, chociaż długość 3' UTR nie jest jako taka uważana za przyczynę NMD danego transkryptu (Toma i wsp. 2015).

Jednym z kluczowych etapów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów na terenie cytoplazmy jest także regulacja procesu translacji. Regulacja tego procesu głównie odbywa się podczas inicjacji translacji. Do czapeczki mRNA na terenie cytoplazmy przyłącza się kompleks eIF4F zawierający czynnik inicjacji translacji eIF4E, helikazę RNA eIF4A oraz białko rusztowania eIF4G (wiążące się z białkiem PABP na ogonie poli(A)). Regulacja translacji może zachodzić poprzez globalną regulację translacji lub regulację określonych grup mRNA. Globalna regulacja translacji zachodzi poprzez modyfikację i dostępność czynników translacyjnych. Fosforylacja eIF2a zmniejsza ilość aktywnych kompleksów inicjacyjnych, a zatem prowadzi do szybkiej redukcji procesu translacji w komórce. Dostępność eIF4E kontrolowana jest przez białka wiążące 4E (4E-BP), które uniemożliwiają oddziaływanie z eIF4G, a tym samym hamują asocjację małych podjednostek rybosomalnych

z mRNA. Regulacja określonych grup transkryptów zachodzi poprzez specyficzne białka wiążące RNA (RBP), często rozpoznające motywy regulatorowe zawarte w 3' i 5' UTR transkryptu, uniemożliwiając w ten sposób interakcję z eIF (Halbeisen i wsp. 2008). Zahamowanie translacji mRNA nie zawsze prowadzi do jego degradacji. Proces ten jest często wykorzystywany przez komórkę w celu tymczasowej zmiany profilu ekspresji białek w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe.

Zgodnie z modelem zamkniętej pętli eIF4G oddziałując jednocześnie z eIF4E na końcu 5' oraz PABP na końcu 3' mRNP, powoduje przestrzenne przybliżenie obu końców transkryptu, co wpływa na stabilizację cząsteczki, a także umożliwia inicjację translacji. Utworzenie zamkniętej pętli umożliwia koordynację pomiędzy translacją, a degradacją mRNA, a także prawdopodobnie recykling rybosomów oraz zapobiega niekontrolowanej degradacji czapeczki (Mangus i wsp. 2003).

Specyficzne oddziaływania RNA-białko w regionie 3' UTR mogą wpływać zarówno na translację jak i stabilizację mRNA. Skracanie lub wydłużanie tego regionu powoduje usunięcie lub wprowadzenie dodatkowych miejsc regulatorowych, co umożliwia wybór alternatywnych miejsc poliadenylacji transkryptu i powstawanie izoform mRNA (Sandberg i wsp. 2008). Modyfikacja w regionie 3' UTR wpływa na potranskrypcyjną regulację translacji mRNA poprzez modyfikację długości ogona poli(A) (Richter 2007).

Regulacja ekspresji genów na terenie cytoplazmy, oprócz koordynacji poprzez białka regulatorowe, może odbywać się także za pomocą kompleksów rybonukleoproteinowych, rozpoznających docelowy transkrypt na zasadzie komplementarności sekwencji ze specyficznym RNA. MicroRNA (miRNA) po asocjacji z białkiem efektorowym ARGONAUTE (AGO) kierują przyłączeniem rybonukleoproteinowego kompleksu RISC do docelowego mRNA na zasadzie parowania zasad, co stymuluje endonukleolityczne cięcie

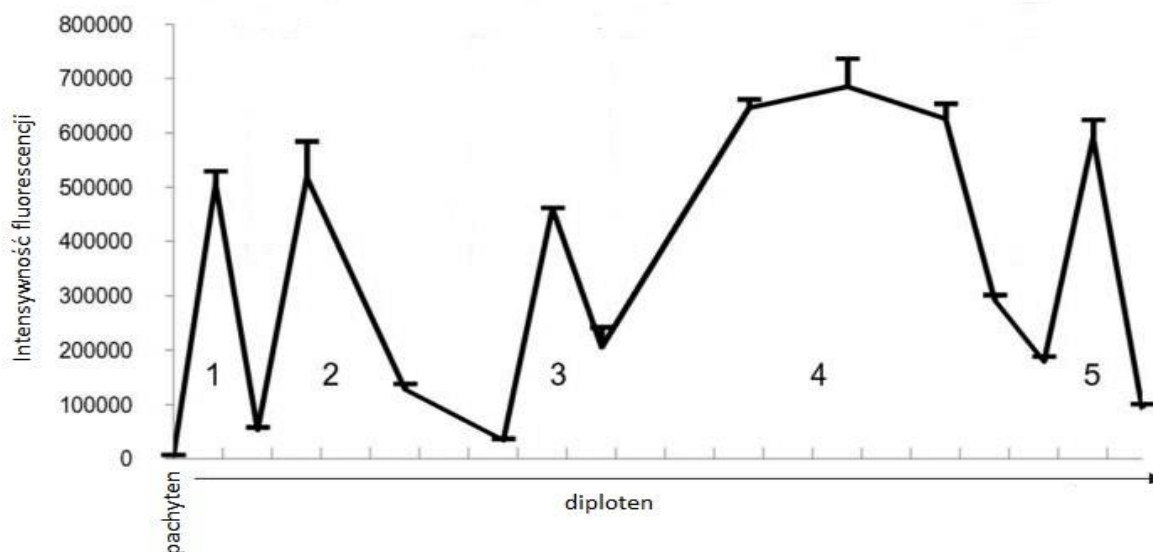
transkryptu lub blokowanie translacji, a zatem potranskrypcyjne wyciszenie ekspresji genów (Mallory i wsp. 2004).

Wiele procesów potranskrypcyjnej obróbki mRNA w cytoplazmie zachodzi na terenie wyspecjalizowanych, konserwowanych ewolucyjnie, nieoblionionych, bogatych w rybonukleoproteiny mikrodomen, nazywanych ciałami cytoplazmatycznymi (Moser i Fritzler 2010). Stanowią one miejsce regulacji czasu translacji oraz degradacji transkryptów mRNA, oraz funkcjonują jako centrum koordynacji równowagi między tymi procesami (Parker i Sheth 2007). W literaturze opisano kilka rodzajów cytoplazmatycznych ciał uczestniczących w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Jednym z rodzajów takich struktur są P-bodies, które ze względu na obecność całej gamy czynników uczestniczących zarówno w stabilizacji (Xu i Chua 2009), jak i degradacji transkryptów (Beggs 2005). P-bodies uważane są za swoiste centra sortowania mRNA i kierowania ich na drogę translacji lub degradacji w zależności od bodźców zewnętrznych oraz stanu fizjologicznego komórki (Lavut i Raveh 2012). Kolejnym znanym typem ciał cytoplazmatycznych są granule stresowe. Ich powstawanie jest wynikiem zablokowania translacji mRNA w komórce pod wpływem stresu w wyniku fosforylacji czynnika inicjującego translację eIF2 α (Moser i Fritzler 2010). Granule stresowe uznawane są za magazyny, z których po powrocie do warunków fizjologicznych, mRNA genów referencyjnych mogą powracać do cytoplazmy i ulegać translacji na polisomach.

Granule płciowe występujące jedynie w komórkach linii płciowej, zlokalizowane są najczęściej w pobliżu otoczki jądrowej (Voronina i wsp. 2011). Postuluje się, że ich funkcja w obróbce, degradacji i/lub kompartmentalizacji (polaryzacji) kluczowych dla rozwoju komórek płciowych i zarodka mRNA jest niezbędna dla prawidłowego ich rozwoju i odróżnicowania (Arkov i Ramos 2010).

2.3. Mikrosporocyty modrzewia europejskiego podczas diplotenu profazy I mejozy

Badania przeprowadzone na mikrosporocytach modrzewia europejskiego wykazały, że diploten stanowi najbardziej aktywny transkrypcyjnie okres podczas pierwszego podziału mejotycznego. Podczas tego okresu mejoocyty charakteryzują się naturalnie występującymi cyklicznymi zmianami konformacji chromatyny. Podobnie do komórek wydzielniczych ssaków (Halpern i wsp. 2015) transkrypcja w mikrosporocytach odbywa się w pulsach transkrypcyjnych (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015). Dekondensacja chromatyny dodatnio skorelowana jest z okresami intensywnej transkrypcji, natomiast podczas okresów kondensacji chromatyny, poziom aktywności transkrypcyjnej znacząco obniża się. Badania poziomu nowo powstałego transkryptu wykazały, iż podczas diplotenu występuje pięć okresów wysokiej aktywności transkrypcyjnej, które przedzielone są krótkimi okresami jej obniżenia (Ryc. 7). Każdy z pięciu okresów wysokiej aktywności transkrypcyjnej związany jest z pojedynczym cyklem syntezy, gromadzenia i transportu poliadenylowanego RNA.



Ryc. 7 Aktywność transkrypcyjna mikrosporocytów podczas diplotenu profazy I mejozy. 1-5 okresy wysokiej aktywności transkrypcyjnej. Za (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015), zmienione.

Dalsze badania wykazały, że etapy wysokiej aktywności transkrypcyjnej są poprzedzone wzrostem syntezy i akumulacji czynników splicingowych i rRNA w jądrze (Smoliński i wsp. 2007, Kołowerzo 2010, Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015).

Cykłom syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA skorelowanych ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej, towarzyszy również cykliczna biosynteza kompleksów UsnRNP. UsnRNA wchodzi w skład tzw. konstytutywnego spliceosomu, niezbędnego podczas procesu splicingu (patrz rozdział 2.2.). Ich synteza skorelowana jest z *de novo* formowaniem ciał Cajala (CB) będących ciałami jądrowymi zaangażowanymi w dojrzewanie i montaż podjednostek spliceosomalnych po ich reimportie z cytoplazmy (Smoliński i wsp. 2011). W obrębie każdego cyklu biogenezy snRNP wzorec lokalizacji zarówno Sm i U snRNA odpowiada kolejnym etapom montażu tych elementów splicingowych. Wykazano, że w okresach intensywnej ekspresji elementów splicingowych, cytoplazmatyczny etap dojrzewania snRNP jest koordynowany przez ciała cytoplazmatyczne bogate w snRNP,

nazwane CsBs (Hyjek i wsp. 2015), w których gromadzą się komponenty dojrzałych snRNP, takie jak U snRNA z pełni uformowaną czapeczką trimetyloguanozynową oraz białka Sm (Smoliński i wsp. 2011).

3. CEL PRACY

Kontrolowana ekspresja określonych genów w komórce jest podstawą funkcjonowania wszystkich organizmów żywych. W ostatnich latach coraz więcej badań skupia się na kluczowej roli zdarzeń potranskrypcyjnych w regulacji ekspresji genów. Procesy te współtworzą ważny i precyzyjny mechanizm koordynujący powstawanie ostatecznego produktu genu, w zależności od aktualnego stanu metabolicznego i zapotrzebowania komórki. Jednym z nowo poznanych mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów jest retencja mRNA na terenie jądra komórkowego. Ze względu na stosunkowo niewielką liczbę doniesień na temat retencji mRNA u roślin, także samo zjawisko retencji pozostaje mało poznane. Ponadto, brak jest danych literaturowych związanych z zaangażowaniem w ten mechanizm domen jądrowych. Wstępne obserwacje mikroskopowe przeprowadzone w naszym zespole badawczym wykazały, że w mikrosporocytach modrzewia występują następujące po sobie okresy wzmożonej aktywności transkrypcyjnej związanej z syntezą znacznych ilości poliadenylowanych transkryptów (poli(A) RNA). Nowo syntetyzowane poli(A) RNA nie jest jednak transportowane od razu do cytoplazmy, a zatrzymywane jest na terenie jądra komórkowego. Celem niniejszej pracy doktorskiej było opisanie zjawiska retencji mRNA w pojedynczym cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA. Wysłunięto hipotezę, że retencja mRNA na terenie jądra komórkowego stanowi potranskrypcyjny mechanizm regulacji ekspresji genów niezbędnych w kolejnych etapach rozwoju komórki roślinnej. W celu realizacji postawionych wyżej celów, zaplanowano następujące zadania badawcze:

(1) identyfikacja transkryptów, które ulegają ekspresji w mikrosporocytach podczas cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA,

(2) określenie czasu retencji mRNA w cyklu, oraz zaangażowanie domen jądrowych w ich retencję,

(3) prześledzenie cyklu eksportu wybranych transkryptów ulegających ekspresji w mikrosporocytach,

(4) weryfikacja w jakiej formie (dojrzałej, czy nie dojrzałej) transkrypty, ulegają retencji na terenie jądra komórkowego.

4. MATERIAŁY

4.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły mikrosporocyty modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) podczas diplotenu profazy I podziału mejotycznego. Mikrosporocyty charakteryzują się niezwykle długim przebiegiem mejozy, w której sama profaza I trwa około sześciu miesięcy. Badania przeprowadzone w kilku sezonach wegetacyjnych wykazały, iż niezależnie od temperatur w danym sezonie, zarówno czas trwania, jak i wzorzec dystrybucji jest podobny. Mikrosporocyty w październiku inicjują stadium leptotenu, a diploten kończą na przełomie marca i kwietnia. W warunkach naturalnych komórki te wykazują relatywnie wysoką synchronizację rozwojową. Dzięki temu z pylników modrzewia uzyskać można stosunkowo dużą i jednorodną populację mikrosporocytów w poszczególnych fazach mejozy, co znacznie ułatwia badania procesów zachodzących w tych komórkach. Dodatkowo, mikrosporocyty modrzewia charakteryzują się stosunkowo cienką peкто-celulozową ścianą komórkową, co znacznie ułatwia pozyskanie protoplastów do badań *in situ*. Wybrane komórki charakteryzują się także dużym rozmiarem (ok. 70 μm średnicy), co pozwala na dokładną obserwację mikroskopową poszczególnych subkompartymentów komórkowych, a także mikrodomen jądrowych i cytoplazmatycznych.

Badania prowadzone w Zakładzie Biologii Komórki UMK wykazały, że mikrosporocyty modrzewia w poszczególnych stadiach rozwojowych charakteryzują się naturalnymi fluktuacjami metabolizmu: stopnia kondensacji chromatyny, aktywności transkrypcyjnej (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015), poziomu syntezy rRNA (Smoliński i wsp. 2007) oraz przestrzennej lokalizacji elementów maszyneryi splicingowej (Smoliński i wsp. 2011). Co więcej, w komórkach tych w sposób naturalny dochodzi do następujących po sobie cykli formowania i zanikania struktur zaangażowanych w metabolizm RNA, takich jak jądrowe

ciała Cajala oraz cytoplazmatyczne ciała bogate w snRNP lub mRNA (Smoliński i wsp. 2011, Hyjek i wsp. 2015, Hyjek i wsp. 2019).

Opisane powyżej cechy umożliwiają obserwację poszczególnych etapów metabolizmu rybonukleoprotein w warunkach fizjologicznych w mikrosporocytach *Larix decidua*, nie indukowanych przez eksperymentatora.

4.2. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed.

Nazwa	Sekwencja (5'-3')	Znakowanie
Hybrydyzacja <i>in situ</i>		
poli(A) RNA	T(T)29	Cy3
PEP mRNA	TGTAACCCGTGCATAAGGTCCACTCGAACGTGC	DIG
CELL2 mRNA	TTCCGATTGCAGAGAGTCACTGTAAGCGCCT	DIG
LHCP mRNA	AACGCAGCCAAGCGCCCCAACATGGCCCATCT	DIG
NAD7 mRNA	TCCATGGATAGTTTCATTTGACATCGTGATGG	DIG
eF1a mRNA	TGGTGACCTTTGCACCAGTGGGATCCTTCT	DIG
ACT mRNA	TCTTCTGGAGCAACTCGAAGCTCATTGTAGA	DIG

eIF5b mRNA	TCTTCACACCAAGTTCATCTGCAAGCTCACGAG	DIG
DNJ mRNA	TCTTTAAGGGCATCCTCTCCATACTGGTCA	DIG
PER40 mRNA	TGAATGTTGCACAACGTGCCTTTCCTATTGTA	DIG
SDH mRNA	ACTTGTTTCGTCTCTTCATAGACCTCCCCACCAAT	DIG
TBA mRNA	ACTGTTGGTGATCTCGGCTACCGAGAGCT	DIG
PABP4 mRNA	ACTCCATAAAGCCATAGCCCTCTGACTGTCCA	DIG
RS6 mRNA	TTCCTTTGCAGAGTCAATGGTGTCACAAGCC	DIG
RPB10 mRNA	GTAATTCAAAGCTTCTCrATGAGATC	DIG
Sm mRNA	SmD1 AGGAGTTGACATAAGTATGAATACACATCT Sm D2 CTATTCACCTTTGGATTTCTAAGAACAATAAT SmD2 GTATATAATTTCTCTTCAAAACTACTTTTCTCT SmE AATACAAGGTTTCATGTACTCATCAAATC	DIG
SmG mRNA	CTTGTCATGTACTTCTTGAGATCCG	DIG
pre-mRNA SmG- intron1	ATTTCTTATTCTTATAACCAGTGAAATGTGA	DIG
pre-mRNA SmG- intron2	GTTATGATATTTTAAGGCAGTTTAAAATGATAT	DIG
pre-mRNA SmG- intron3	TTTTATCACATTGAAATATTTGAAAACAAC	DIG

pre-mRNA SmD1- intron1	GAAAAACATATCTAAGTTCAAGAAAT	DIG
pre-mRNA SmD1- intron2	ATTCTTTGAACTTGCACTACTTTGTAGAG	DIG
pre-mRNA SmD2- intron1	GTATATTCTTGGAAGTTATGGATCATGAA	DIG
pre-mRNA SmD2- intron2	TTGAATACAAACAATAGTTGCAAAGAACATTCC	DIG
pre-mRNA SmD2- intron3	AGAAAGGTTAAAATATGCTGAATGGAGTAT	DIG
pre-mRNA RPB10	AAAAGCAAAGATAAGACGATTGATG ATCTAGCAATATGAAGACAAGTCCAAAAATAT	DIG
qPCR		
F_SmG mRNA	TCCTTTTCGAGGCAAACGGAG	-
R_SmG mRNA	GGCAACTTTGGAACCTCACG	-
F_ACT mRNA	CGGGGTTTGCTGGAGATGA	-
R_ACT mRNA	GCCCCATACCAACCATCACA	-
F_EF1A1 mRNA	TTGTGCGAGTCTCTCTGCTC	-

R_EF1A1 mRNA	CAAAAACGCCTGGCAGAGTC	-
--------------	----------------------	---

4.3. Przeciwciała

Nazwa	Klonalność	Pochodzenie	Rozpoznawany antygen	Firma	Znakowanie
Przeciwciała pierwotne					
anty-BrdU	monoklonalne	mysie	bromourydyna	GE Healthcare	-
3E10	monoklonalne	szczurze	Fosforylowana Ser2 w domenie CTD polimerazy II RNA	Chromotek	-
ANA No.5	poliklonalne	ludzkie	Sm	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta GA 30333, USA	-
anty-DIG	monoklonalne	królicze	DIG	Thermo Fisher Scientific	-
MAD	monoklonalne	mysie	DIG	Roche	-

Przeciwciała wtórne					
anty-mysie	poliklonalne	koźle	mysie IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488
anty-królicze	poliklonalne	koźle	królicze IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488
anty-królicze	poliklonalne	koźle	królicze IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488+
anty-ludzkie	poliklonalne	koźle	ludzkie IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488

4.4 Odczynniki

Nazwa

5-bromouracyl
 acetylowana BSA (acBSA)
 Agenocourt RNAClean XP
 albumina wołowa (BSA)
 alkohol etylowy
 alkohol izopropylowy
 borowodorek sodu (NaBH₄)
 celuloza Onozuka R10
 chlorek potasu (KCl)
 chlorek wapnia (NaCl)
 chloroform
 cytrynian trójsodowy (C₆H₅Na₃O₇)
 diwodorofosforan potasu (KH₂PO₄)
 ditiotetriol (DTT)
 EDTA

Firma

Sigma-Aldrich
 Aurion
 Beckman Coulter
 Sigma-Aldrich
 POCH S.A.
 POCH S.A.
 Sigma-Aldrich
 Serva
 POCH S.A.
 POCH S.A.
 POCH S.A.
 POCH S.A.
 POCH S.A.
 Fluka
 Sigma-Aldrich

fenol:chloroform	Sigma-Aldrich
formamid	Sigma-Aldrich
glycoBlue Coprecipitant	Ambion
Hoechst 33342	Life Technologies
kwas cytrynianowy (C ₆ H ₈ O ₇)	POCH S.A.
octan potasu	Sigma-Aldrich
paraformaldehyd 16%	Polysciences
pektynaza	Sigma-Aldrich
Pipes	Sigma-Aldrich
ProLong Gold	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Trizol	Sigma-Aldrich
TriReagent	Invitrogen
Twin 20	Sigma-Aldrich
wodorofosforan sodu (Na ₂ HPO ₄)	POCH S.A.

Enzymy i inhibitory

DNaza Turbo (2U/ µl)	Sigma-Aldrich
SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific
Inhibitor proteaz cOmplete Mini, EDTA-free	Roche

Zestawy odczynników

PicoPure RNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific
Direct-zol RNA MiniPrep	Zymo Research
RNA 6000 Pico Kit	Agilent
High Sensitivity DNA Kit	Agilent
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
KAPA Library Quantification Kit	Roche
MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle)	Illumina
Total RNA-seq Library Prep Kit	Lexogen
Ribo-Zero rRNA Removal Kit	Illumina
TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant	Illumina

4.5. Roztwory, bufor i mieszaniny

Bufor PBS 10x (500ml)

NaCl 40 g

KCl 1 g

Na₂HPO₄ 7,2 g

KH₂PO₄ 1,2 g

woda bidestylowana

Bufor autoklawowano (121°C, 1 atm., 20 minut) i ustalano pH = 7,2.

Bufor cytrynianowy 10x (500 ml)

Bufor A – kwas cytrynianowy (4,2 g/200 ml H₂O)

Bufor B – cytrynian trójsodowy (8,5 g/300 ml H₂O)

Roztwory mieszano, a następnie ustalano pH = 4,8.

Bufor hybrydyzacyjny

stężenie końcowe

formamid 30%

SSC 4x

100x mieszanina Denhardt'a (1% Ficoll 400, 1% PVP, 1% BSA) 5x

EDTA 1 mM

bufor fosforanowy 50 mM

20x SSC (200 ml)

NaCl 35,06 g

cytrynian trójsodowy 17,64 g

woda bidestylowana

Roztwór mieszano, a następnie ustalano pH = 7,0.

Bufor RNP do ekstrakcji frakcji cytoplazmatycznej

stężenie końcowe

Tris-HCl pH = 9,0 200 mM

octan potasu 110 mM

Triton X-100 0,5 % (v/v)

Tween 20 0,1 % (v/v)

DTT 2,5 mM

inhibitor proteaz Roche 1 tabletka/10 ml

inhibitor RNaz 40 U/ml

5. METODY

5.1. Analizy mikroskopowe

5.1.1. Przygotowanie materiału do obserwacji mikroskopowych

Izolacja protoplastów

Kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. zbierano w odstępach tygodniowych, od października do marca, w pięciu kolejnych sezonach wegetacyjnych (lata 2013 – 2018). Okres ten odpowiada kolejnym stadiom profazy I mejozy.

Po usunięciu łusek okrywających, świeżo zebrane kwiatostany utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA) w 0,1M buforze PIPES o pH 7,2 przez 12h. W celu wyeliminowania powietrza znajdującego się w materiale roślinnym, przez pierwszą godzinę utrwalanie prowadzono na lodzie w pompie próżniowej (0,1 MPa), a następnie przez 11h w temperaturze +4°C. Utrwalony materiał płukano w trzech zmianach buforu PBS pH 7,2 (3x 10 min) oraz trzykrotnie w 0,01M buforze cytrynianowym pH 4,8 (3x 5 min). Do immunodetekcji nowo powstałych transkryptów pylniki przed utrwalaniem inkubowano w 80 µmol 5-bromouracylu przez 90 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, pylniki przepłukiwano buforem PBS i utrwalono.

Następnie mikrosporoocyty izolowano poprzez mechaniczne rozgniatanie pylników szklaną bagietką na szkiełku zegarkowym w 0,01M buforze cytrynianowym pH 4,8. W celu usunięcia ściany komórkowej, pozyskaną zawiesinę komórkową poddawano trawieniu enzymatycznemu w mieszaninie: 4% celulazy Onozuka R10 i 27 U/ml pektynazy w 0,01M buforze cytrynianowym pH 4,8. Inkubację prowadzono przez 12,5 min w temperaturze 37°C, przy ciągłym mieszaniu (100 rpm). Po trawieniu materiał płukano trzykrotnie w 0,01 M buforze cytrynianowym pH 4,8 (3x 3 min) oraz trzykrotnie w PBS pH 7,2 (3x 3 min).

Następnie protoplasty zawieszano w PBS i nakładano na uprzednio zmrożonych (-80°C) żelatynowanych szkiełkach podstawowych i pozostawiano do wyschnięcia.

5.1.2. Lokalizacje białek i RNA

Przed przystąpieniem do wykonania reakcji, protoplasty uwadniano i permeabilizowano w 0,1% roztworze Triton X-100 w PBS pH 7,2 przez 30 min, a następnie płukano w PBS pH 7,2 (3x 3 min). Kontrole specyficzności wszystkich reakcji przeprowadzono według podanych poniżej protokołów, z ominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym (inkubacja w acBSA w PBS pH 7,2) oraz z ominięciem sondy oligonukleotydowej (inkubacja z samym buforem hydrydazyjnym).

Lokalizacja nowopowstałych transkryptów i poli(A) RNA

Reakcje wykonywano zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z mysim przeciwciałem pierwotnym anti-BrdU, w stosunku 1:1000 w nukleazie, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze +4°C
2. Płukanie w PBS pH 7,2 (5x 3min).
3. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anti-mysim sprzężonym z Alexa488, w stosunku 1:1000 w 0,01% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1h w temperaturze +37°C.
4. Płukanie w PBS pH 7,2 (5x 3min).
5. Inkubacja z sondą oligo(dT) sprzężoną z Cy3, w stosunku 1:500 w buforze hydrydazyjnym, w wilgotnej komorze (wypełnionej 30% formamidem) w temperaturze +26°C przez noc
6. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (5 x 1 min),
- 2 x SSC (5 x 1 min),
- 1 x SSC (1 x 10 min),
- PBS (1 x 3 min).

7. Inkubacja z roztworem Hoechst, w stosunku 1:5000 w PBS pH 7,2, przez 5 min w temperaturze pokojowej.

8. Płukanie w PBS pH 7,2, osuszenie.

9. Zamknięcie preparatów w medium przedłużającym efekt fluorescencji ProLong Gold.

Lokalizacja mRNA i poli(A) RNA

Reakcje wykonywano zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z sondą oligonukleotydową sprzężoną z DIG, w stosunku 1:200 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze (wypełnionej 30% formamidem) w temperaturze +26°C przez 4h, następnie dodano sondę oligo(dT) sprzężoną z Cy3, w stosunku 1:500 w buforze hybrydyzacyjnym i inkubowano w tych samych warunkach przez noc.

2. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (5 x 1 min),
- 2 x SSC (5 x 1 min),
- 1 x SSC (1 x 10 min),
- PBS (1 x 3 min).

3. Inkubacja z króliczym przeciwciałem pierwotnym anti-DIG, w stosunku 1:200 w 0,01% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze +11°C.

4. Płukanie w PBS pH 7,2 (5x 3 min).

5. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anti-króliczym sprzężonym z Alexa488/Alexa488+, w stosunku 1:1000 w 0,01% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1h w temperaturze +37⁰C.
6. Płukanie w PBS pH 7,2 (5x 3 min).
7. Inkubacja z roztworem Hoechst, w stosunku 1:5000 w PBS pH 7,2, przez 5 min w temperaturze pokojowej.
8. Płukanie w PBS pH 7,2, osuszenie.
9. Zamknięcie preparatów w medium przedłużającym efekt fluorescencji ProLong Gold.

Lokalizacja białek Sm i mRNA Sm

Reakcje wykonywano zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z 0,1% NaBH₄ (2x 5 min).
2. Płukanie 1x PBS pH 7,2.
3. Inkubacja z 2% acBSA w PBS pH 7,2 przez 15 min w temperaturze pokojowej.
4. Inkubacja z ludzkim przeciwciałem pierwotnym anti-Sm (ANA No. 5), w stosunku 1:300 w 0,2% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze +11⁰C.
5. Płukanie w PBS pH 7,2 (5x 3min).
6. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anti-ludzkim sprzężonym z Alexa488, w stosunku 1:200 w 0,01% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1h w temperaturze +37⁰C.
7. Płukanie w PBS pH 7,2 (5 x 3 min).
8. Inkubacja z sondami oligonukleotydowymi sprzężonymi z DIG, w stosunku 1:200 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze (wypełnionej 30% formamidem) w temperaturze +26⁰C przez noc.
9. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (5 x 1 min),
- 2 x SSC (5 x 1 min),
- 1 x SSC(1 x 10 min),
- PBS (1 x 3 min).

10. Inkubacja z mysim przeciwciałem pierwotnym anti-DIG (MAD), w stosunku 1:200 w 0,05% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze +11⁰C.

11. Płukanie w PBS pH 7,2 (5x 3 min).

12. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anti-mysim sprzężonym z Alexa488, w stosunku 1:1000 w 0,01% acBSA w PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1h w temperaturze +37⁰C.

13. Płukanie w PBS pH 7,2 (5 x 3min).

14. Inkubacja z roztworem Hoechst, w stosunku 1:5000 w PBS pH 7,2, przez 5 min w temperaturze pokojowej.

15. Płukanie w PBS pH 7,2, osuszenie.

16. Zamknięcie preparatów w medium przedłużającym efekt fluorescencji ProLong Gold.

5.1.3. Mikroskopia

Mikroskopia konfokalna

Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego Leica TCS Sp8, wyposażonego w 7 linii lasera wzbudzającego fluorescencję od UV (405 nm) do dalekiej czerwieni (633 nm). W celu zapewnienia odseparowania rejestrowanych sygnałów pomiędzy kanałami, skanowanie preparatów prowadzono w trybie

sekwencyjnym (osobno dla każdego kanału). Cięcia optyczne wykonywano z interwałem 0,5 μm . Wyniki rejestrowano za pomocą oprogramowania LAS AF.

5.1.4. Analiza obrazu

Do obróbki i analizy obrazu wykorzystano oprogramowanie ImageJ (Schneider i wsp. 2012).

Pomiary ilościowe

Obrazy przeznaczone do pomiarów ilościowych rejestrowano przy identycznych warunkach akwizycji (moc lasera, zakres zbieranego światła przez detektor, wzmocnienie na fotopowielaczu, rozdzielczość). W celu wyeliminowania niespecyficznego tła (wynikającego głównie z autofluorescencji cytoplazmy komórek roślinnych), na podstawie przeprowadzonych reakcji kontrolnych ustalono poziom odcięcia tła (ang. threshold), który następnie uwzględniano przed rozpoczęciem pomiarów. Dla każdego wariantu (stadium) wykonywano pomiary dla 10 – 30 komórek, w zależności od eksperymentu. Poziom fluorescencji wyrażono w jednostkach względnych, jako średnia intensywność na μm^3 .

5.2. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym do zmierzenia poziomu ekspresji genów kodujących białka Sm

Izolacja RNA

1. Świeżo zebrane kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C . Materiał roślinny rozcierano w ciekłym

azocie, a następnie dodawano 1 ml odczynnika Trizol, dokładnie mieszano i inkubowano przez 5 min. Następnie wirowano przy prędkości 12000 xg przez 5 min w temperaturze +4°C, supernatant pobierano do nowej probówki typu eppendorf i inkubowano 5 min.

2. Dodawano po 200 µl chloroformu, dokładnie mieszano i inkubowano 3 min. Następnie wirowano przy prędkości 12000 xg przez 15 min w temperaturze +4°C.

3. Fazę wodną zbierano do nowych probówek typu eppendorf i ponownie łączono z chloroformem w stosunku 1:1 (v/v). Mieszaninę wirowano przy prędkości 12000 xg przez 15 min w temperaturze +4°C.

4. Fazę wodną zbierano do nowych probówek typu eppendorf i wytrącano w obecności izopropanolu w stosunku 1:1, 3M octanu sodu pH 5,2 (24 µl) oraz GlycoBlue (6µl). RNA wytrącano przez 1h w temperaturze -80°C.

5. Próbkę wirowano przy prędkości 18000 xg przez 30 min w temperaturze +4°C. Supernatant usuwano.

6. Otrzymany osad płukano dwukrotnie w zimnym 75% etanolu (500 µl) i wirowano przy prędkości 14000 rpm przez 5 min w temperaturze +4°C. Supernatant usuwano.

7. Otrzymany osad suszono przez 10 min w temperaturze +37°C. Następnie RNA rozpuszczano w 17 µl H₂O.

8. W celu wyeliminowania zanieczyszczeń DNA, próbki poddawano inkubacji z DNazą TURBO DNA-free (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcję prowadzono w objętości 20 µl, przez 30 min w temperaturze +37°C.

9. Po inaktywacji, próbki wirowano przy prędkości 14000 rpm przez 1,5 min w temperaturze pokojowej. RNA przenoszono z osadu do nowych probówek typu eppendorf.

10. Następnie, RNA oczyszczano z zastosowaniem mieszaniny fenol:chloroform pH 4,5. Objętość RNA wyrównywano do 200 µl oraz dodawano mieszaninę fenol:chloroform pH 4,5 w stosunku 1:1. Po zwirowaniu (12000 rpm przez 5 min), fazę wodną przenoszono do nowej

próbki typu eppendorf i mieszano z chloroformem w stosunku 1:1. Próbkę ponownie wirowano (12000 rpm przez 5 min).

11. Fazę wodną zbierano do nowych próbek typu eppendorf i wytrącano w obecności 100% etanolu w stosunku 1:2,5 (v/v) przez noc, w temperaturze -80°C .

12. Próbkę wirowano przy prędkości 12000 rpm przez 20 min w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatant usuwano.

13. Otrzymany osad płukano w zimnym 75% etanolu (500 μl) i wirowano przy prędkości 12000 rpm przez 5 min w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatant usuwano.

14. Otrzymany osad suszono przez 5 - 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie RNA rozpuszczano w 12-20 μl H_2O .

Odwrotna transkrypcja

W celu otrzymania cDNA do analiz PCR w czasie rzeczywistym, RNA poddawano odwrotnej transkrypcji (RT, ang. reverse transcription). Zastosowano enzym RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) oraz startery oligo(dT), zgodnie z zaleceniami producenta enzymu. Reakcję prowadzono zgodnie z protokołem:

- denaturacja RNA (5 min, $+65^{\circ}\text{C}$),
- odwrotna transkrypcja (1h, $+42^{\circ}\text{C}$),
- inaktywacja (10 min, $+70^{\circ}\text{C}$).

Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C .

PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative PCR*)

Mieszanina reakcyjna (30 μl) składała się z: 15 μl odczynnika 2X Power SYBR Green PCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific), 1 μl matrycy cDNA oraz pary specyficznych starterów

(0,2 μ M każdy). Reakcję prowadzono z wykorzystaniem aparatu RotorGene 6000 Thermocycler (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Stosowano następujący profil termiczny:

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
denaturacja wstępna	95 ⁰ C	10 min	1
denaturacja	95 ⁰ C	30s	45
przyłączenie starterów	52 ⁰ C	60s	
amplifikacja	72 ⁰ C	60s	
denaturacja	od 72 do 95 ⁰ C	5s na każdy 1 ⁰ C	1

Specyficzność reakcji potwierdzono przez pojawienie się jednego pików w analizie krzywej topnienia. Wartości Ct zostały określone za pomocą Real-time PCR Miner (Zhao i Fernald 2005). Względną ekspresję genów obliczono na podstawie modeli obliczeniowych skorygowanych pod względem wydajności (Pfaffl 2004) z normalizacją do dwóch genów referencyjnych: czynnika 1alfa 1 (EF1A1, numer dostępu NCBI: JX157845) i aktyny (numer dostępu NCBI: AB523401). Wszystkie analizy wykonywano w trzech powtórzeniach technicznych. Dla każdej pary starterów wykonywano dodatkowo reakcje kontrolne bez matrycy cDNA (NTC, ang. no template control).

5.3. Analizy kwasów nukleinowych

5.3.1. Izolacja RNA do analizy transkryptomu w cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA

Świeżo zebrane kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. zbierano podczas czwartego cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA określonego na podstawie badań *in situ*. Wszystkie etapy eksperymentów wykonywano na lodzie oraz przy zastosowaniu warunków wolnych od RNaz (roztwory, bufony, odczynniki, próbki, końcówki do pipet, itd.). Po usunięciu łusek okrywających, ze świeżo zebranych kwiatostanów, mikrosporocyty izolowano poprzez mechaniczne rozgniatanie pylników szklaną bagietką na szkiełku zegarkowym w PBS z DEPC pH=7,2. W celu usunięcia tkanek okrywających, zawiesinę filtrowano przy użyciu sterylnych sit komórkowych (100 µm). Otrzymaną zawiesinę wirowano w +4⁰C przez 10 min przy prędkości 10000xg. Supernatant wylewano, natomiast zawiesinę komórek zawieszano w 200 µl Extraction Buffer w przypadku izolacji PicoPure RNA Isolation Kit, lub 500µl TriReagent przy izolacji Direct-zol RNA Miniprep. Podczas izolacji PicoPure RNA Isolation Kit mieszaninę komórkową inkubowano w +42⁰C przez 30 min, następnie wirowano 2 min przy prędkości 5000xg, pobierano supernatant i mieszano go w stosunku 1:1 (v/v) z 70% etanolem. Dalsza procedura przebiegała zgodnie z zaleceniami producenta. Przy izolacji Direct-zol RNA Miniprep mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej, następnie wirowano przez 10 min przy prędkości 10000 xg w temp. +4⁰C. Pobierano supernatant i mieszanego z 100% etanolem w stosunku 1:1 (v/v). Dalsza procedura przebiegała zgodnie z zaleceniami producenta.

5.3.2. Frakcjonowanie i izolacja RNA do analiz transkryptomu cytoplazmatycznego

Świeżo zebrane kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C .

W celu pozyskania frakcji cytoplazmatycznej, materiał roślinny rozcierano w ciekłym azocie, a następnie dodawano bufor do ekstrakcji rybonukleoprotein w proporcji 10 ml na 1,5 g materiału (bufor RNP; 200 mM Tris-HCl pH 9,0, 110 mM octan potasu, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (v/v) Tween 20, 2,5 mM DTT, inhibitor proteaz Roche). Po rozmrożeniu na lodzie (~5 min), materiał filtrowano przez pojedynczą warstwę Miracloth (\varnothing 22-25 μm ; Merck Milipore) i wirowano w wirówce wychylnej przy prędkości 1500xg, przez 2 min w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Uzyskany supernatant stanowił frakcję cytoplazmatyczną komórek pylnika, wykorzystywaną do dalszych oznaczeń.

Próbki następnie poddawano izolacji RNA.

1. Do próbek dodawano po 1 ml odczynnika Trizol i inkubowano przez 5 min. Następnie dodawano po 200 μl chloroformu, dokładnie mieszano i wirowano przy prędkości 10000xg przez 10 min w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$.
2. Fazę wodną zbierano do nowych probówek typu eppendorf i ponownie łączono z chloroformem w stosunku 1:1 (v/v). Mieszaninę wirowano przy prędkości 10000xg przez 10 min w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$.
3. Fazę wodną zbierano do nowych probówek typu eppendorf i wytrącano w obecności izopropanolu w stosunku 1:1, 3M octanu sodu pH 5,2 (24 μl) oraz GlycoBlue (6 μl). RNA wytrącano przez 1h w temperaturze -80°C .
4. Próbki wirowano przy prędkości 18000 xg przez 30 min w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatant usuwano.

5. Otrzymany osad płukano dwukrotnie w zimnym 75% etanolu (500 μ l) i wirowano przy prędkości 14000 rpm przez 5 min w temperaturze +4⁰C. Supernatant usuwano.
6. Otrzymany osad suszono przez 10 min w temperaturze +37⁰C. Następnie RNA rozpuszczano w 17 μ l H₂O.
7. W celu wyeliminowania zanieczyszczeń DNA, próbki poddawaniu inkubacji z DNazą TURBO DNA-free (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcję prowadzono w objętości 20 μ l, przez 30 min w temperaturze +37⁰C.
8. Po inaktywacji, próbki wirowano przy prędkości 14000 rpm przez 1,5 min w temperaturze pokojowej. RNA przenoszono z nad osadu do nowych próbek typu eppendorf.
9. Następnie RNA oczyszczano z zastosowaniem mieszaniny fenol:chloroform pH 4,5. Objętość RNA wyrównywano do 200 μ l oraz dodawano mieszaninę fenol:chloroform pH 4,5 w stosunku 1:1. Po zwirowaniu (12000 rpm przez 5 min), fazę wodną przenoszono do nowej próbki typu eppendorf i mieszano z chloroformem w stosunku 1:1. Próbkę ponownie wirowano (12000 rpm przez 5 min).
10. Fazę wodną zbierano do nowych próbek typu eppendorf i wytrącano w obecności 100% etanolu w stosunku 1:2,5 (v/v) przez noc, w temperaturze -80⁰C.
11. Próbkę wirowano przy prędkości 12000 rpm przez 20 min w temperaturze +4⁰C. Supernatant usuwano.
12. Otrzymany osad płukano w zimnym 75% etanolu (500 μ l) i wirowano przy prędkości 12000 rpm przez 5 min w temperaturze +4⁰C. Supernatant usuwano.
13. Otrzymany osad suszono przez 5 - 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie RNA rozpuszczano w 12-20 μ l H₂O.

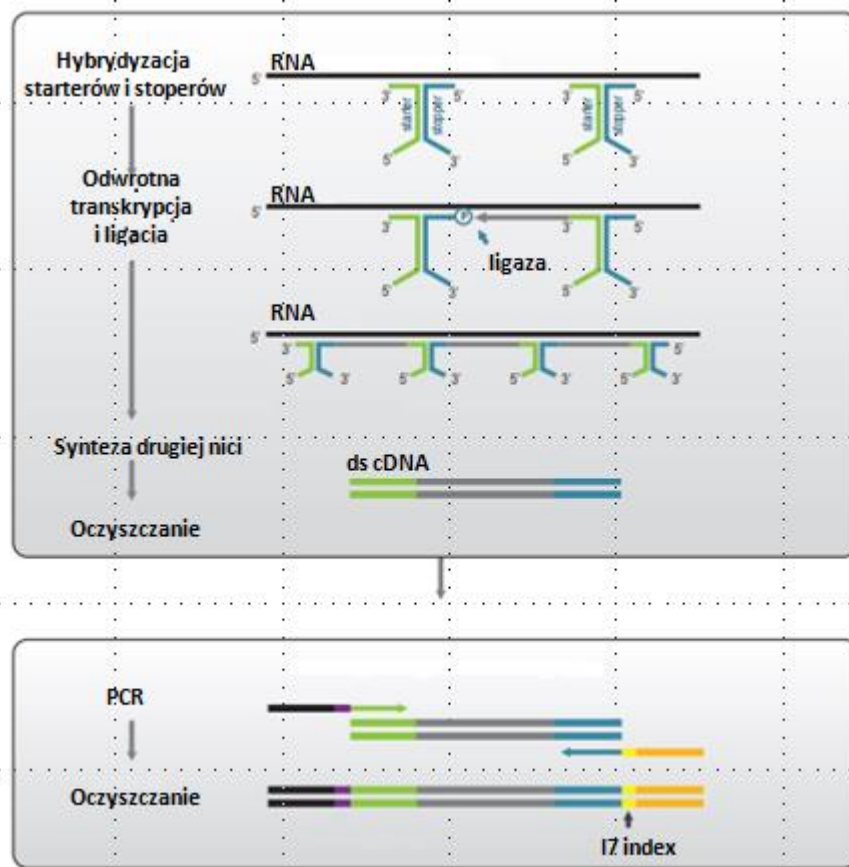
5.3.3. Analiza ilościowa i jakościowa kwasów nukleinowych

RNA oraz biblioteki cDNA poddawano analizie na aparaturze NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) oraz na aparaturze Bioanalyzer 2100 (Agilent). Do analizy RNA stosowano gotowy zestaw odczynników RNA 6000 Pico kit (Agilent), natomiast do analizy bibliotek cDNA – High Sensitivity DNA kit (Agilent), zgodnie z zaleceniami producenta. Dodatkowo, biblioteki cDNA poddawano analizie ilościowej metodą fluorymetryczną na aparaturze Qubit, przy zastosowaniu zestawu odczynników Qubit dsDNA HS Assay Kit.

5.3.4. Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania

Synteza bibliotek cDNA do analizy transkryptomu w cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA

Po analizie jakościowej i ilościowej, RNA poddano deplekcji rybosomalnego RNA przy użyciu Ribo-Zero Plant rRNA Removal Kit (Illumina) zgodnie z protokołem udostępnionym przez producenta. Następnie RNA oczyszczano przy pomocy Agenocourt RNAClean XP Kit zgodnie z zaleceniami producenta. RNA ponownie poddawano analizie jakościowej i ilościowej, a następnie wykorzystano je jako matrycę do syntezy bibliotek cDNA do sekwencjonowania. Zastosowano dostępny komercyjnie zestaw odczynników Total RNA Seq Library Preparation Kit (Lexogen), przeznaczony do sekwenatora MiSeq (Illumina). Wszystkie etapy przygotowania bibliotek cDNA wykonywano zgodnie z protokołem udostępnionym przez producenta. Etapy te obejmowały kolejno: hybrydyzację starterów i stoperów, odwrotną transkrypcję i ligację, syntezę dwuniciowego cDNA, oczyszczanie, wzbogacenie bibliotek z wykorzystaniem PCR, ponowne oczyszczanie (Ryc. 8).

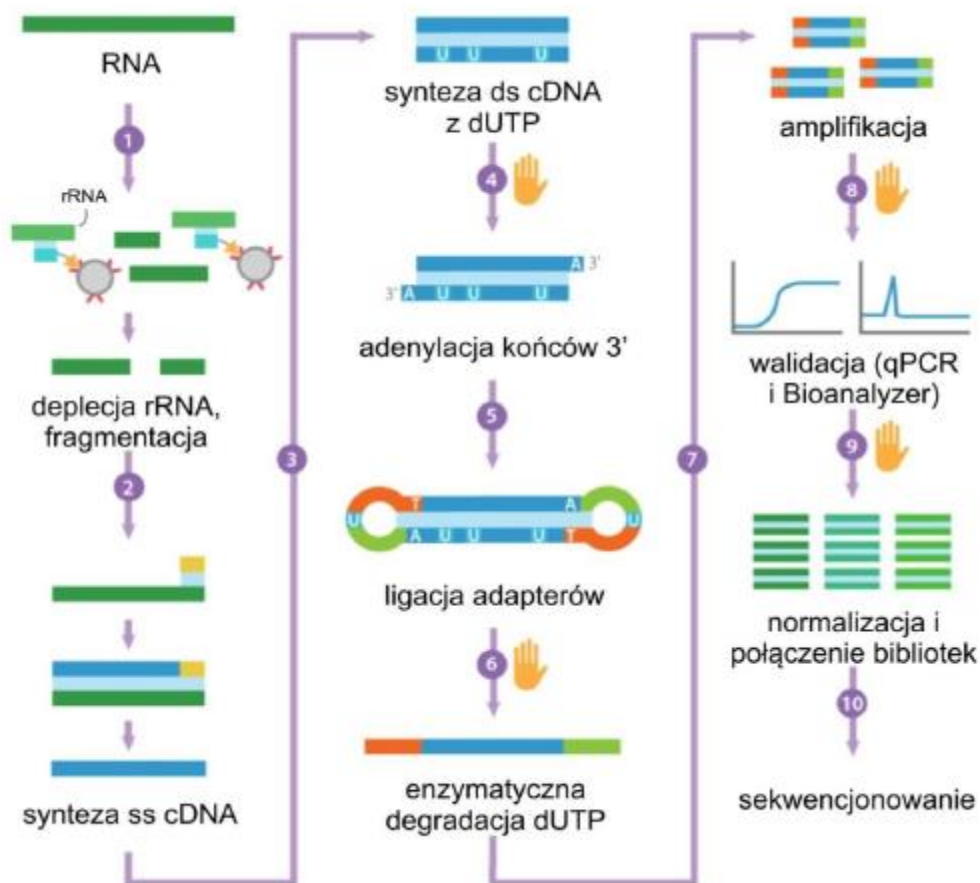


Ryc. 8 Schemat protokołu przygotowania bibliotek cDNA do sekwencjonowania za pomocą zestawu Total RNA Seq Library Preparation Kit (Lexogen).

Synteza bibliotek cDNA do analizy transkryptomu cytoplazmatycznego

Po analizie jakościowej i ilościowej, RNA wykorzystano jako matrycę do syntezy bibliotek cDNA do sekwencjonowania. Zastosowano dostępny komercyjnie zestaw odczynników TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant (Illumina), przeznaczony do sekwenatora MiSeq (Illumina). Wszystkie etapy przygotowania bibliotek cDNA wykonywano zgodnie z protokołem udostępnionym przez producenta. Etapy te obejmowały kolejno: deplecję

rybosomalnego RNA, fragmentację RNA, odwrotną transkrypcję, syntezę dwuniciowego cDNA, adenylację końców 3', ligację adapterów TruSeq oraz wzbogacenie bibliotek z wykorzystaniem PCR (Ryc. 9).



Ryc. 9 Schemat protokołu przygotowania bibliotek cDNA do sekwencjonowania za pomocą zestawu TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant (Illumina).

Analiza ilościowa qPCR

Ostateczne stężenie bibliotek cDNA oznaczano metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. quantitative PCR) przy użyciu zestawu odczynników KAPA Library Quantification Kit Illumina (KAPA Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta.

5.3.5. Sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna

Sekwencjonowanie oraz wstępna analiza danych zostały wykonane w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Biblioteki cDNA sekwencjonowano na aparaturze MiSeq Illumina, zgodnie z zaleceniami producenta. Zastosowano zestaw odczynników do sekwencjonowania MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle; Illumina). Otrzymane odczyty zostały przefiltrowane pod względem jakości przy pomocy programu PRINSEQ-lite (Schmieder i Edwards 2011) (przycinanie do średniej jakości ≥ 30 , brak N, długość po przycięciu min. 100 nt). Odczyty spełniające kryteria jakości były następnie składane w kontigi (ang. contigs), odpowiadające pojedynczym transkryptom z użyciem programu Trinity (Grabherr i wsp. 2011). Wyniki otrzymano w postaci listy transkryptów w formacie FASTA do dalszej analizy. Wybrane sekwencje cDNA posłużyły jako dane wejściowe dla BLASTX (dla potencjalnych sekwencji mRNA). Następnie na podstawie analizy homologii każdemu białku została przypisana potencjalna funkcja (przy zastosowaniu terminologii GO, ang. Gene Ontology). Analizy funkcjonalne wykonywano przy użyciu oprogramowania BLAST2GO (Götz i wsp. 2008).

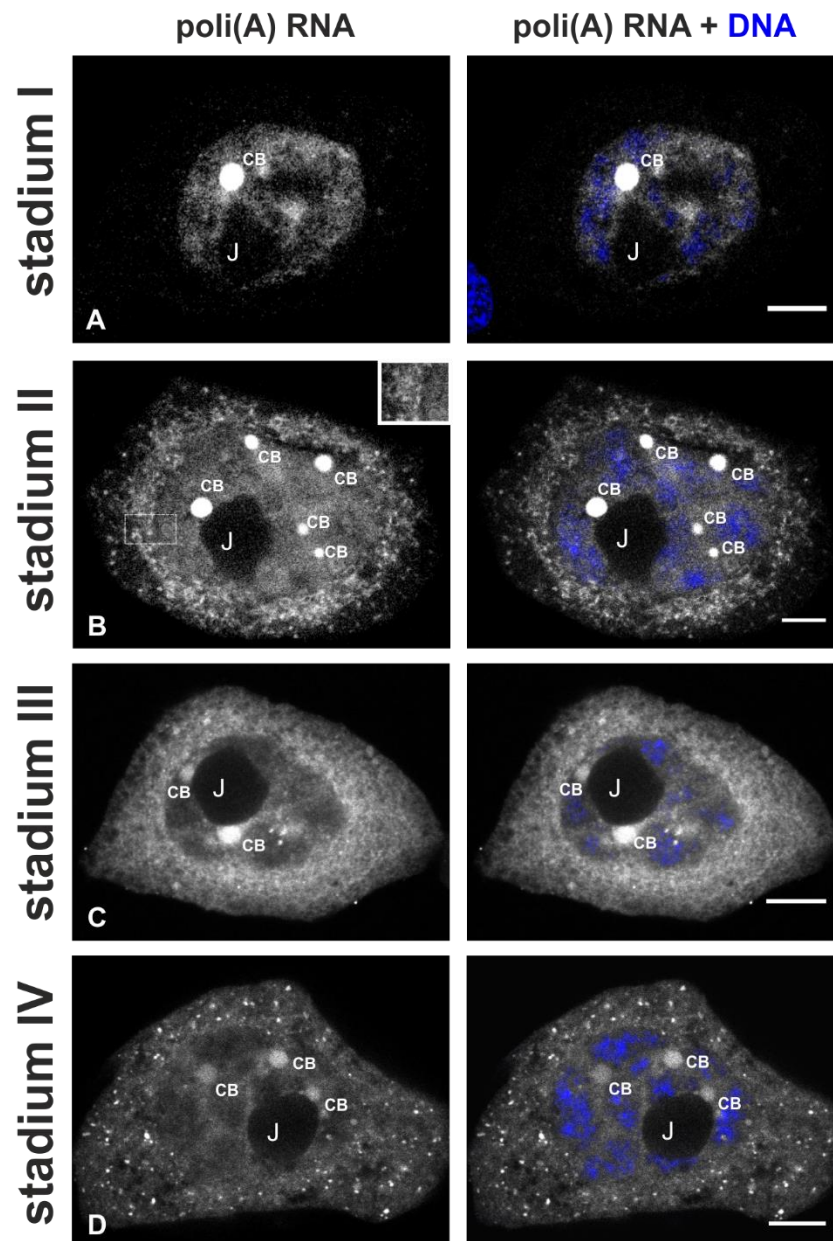
6. WYNIKI

6.1. Poli(A) RNA ulega retencji na terenie jądra komórkowego

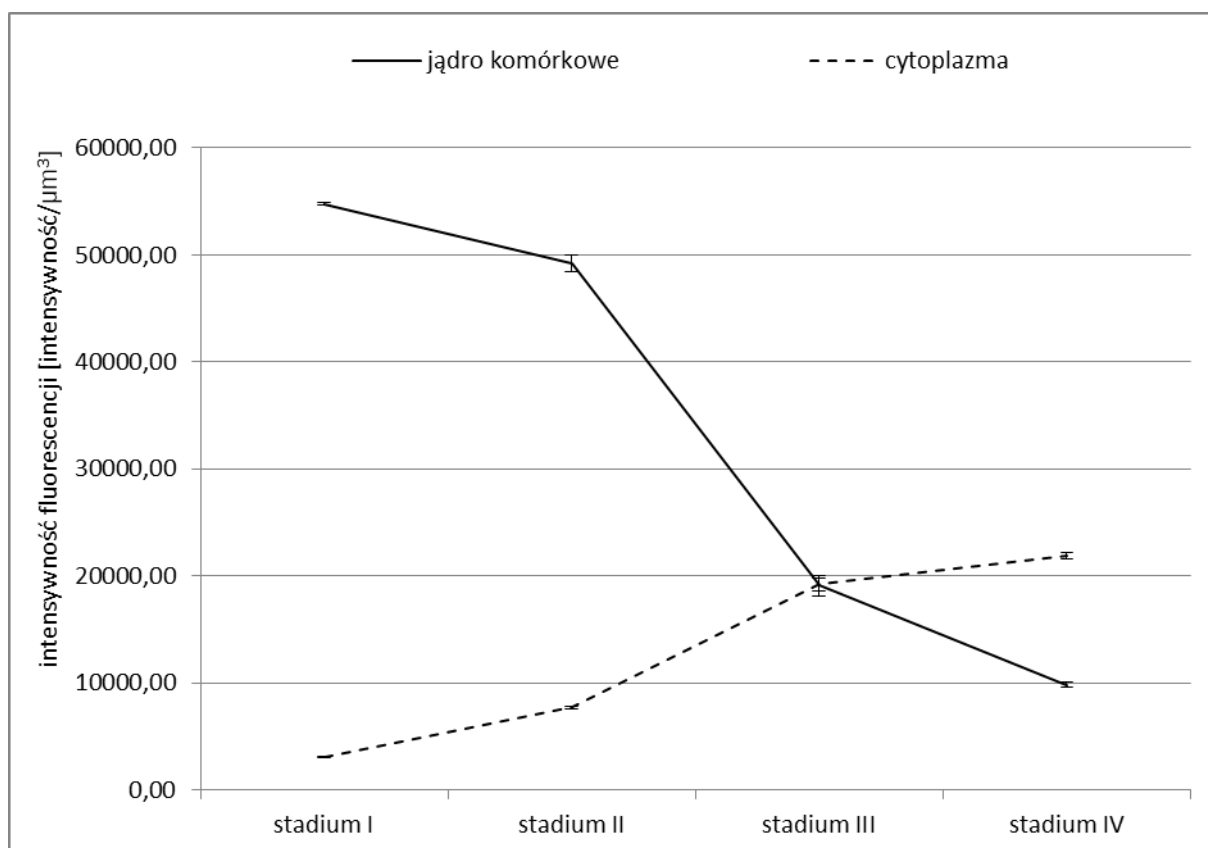
Wcześniejsze badania przeprowadzone w mikrosporocytach modrzewia europejskiego wykazały, że podczas diplotenu występuje pięć okresów wysokiej aktywności transkrypcyjnej, przedzielonej okresami jej wyciszenia (patrz Ryc. 7). Każdy z pięciu okresów wysokiej aktywności transkrypcyjnej związany jest z syntezą oraz transportem poliadenylowanego RNA do cytoplazmy. Znaczna część nowo syntetyzowanego poli(A) RNA obserwowana jest nadal na terenie jądra komórkowego, nawet w okresie, gdy aktywność transkrypcyjna znacząco maleje. W jądrze komórkowym akumulacja RNA obserwowana jest zarówno na terenie nukleoplazmy jak i w ciałach Cajala, a transport do cytoplazmy odbywa się dopiero w późniejszych etapach cyklu.

Do dalszej analizy wybrano czwarty okres wysokiej aktywności transkrypcyjnej mikrosporocytów (patrz Ryc. 7), który charakteryzował się najwyższym poziomem syntezy transkryptów oraz najdłuższym czasem trwania (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015), co w znaczący sposób ułatwiło obserwację kolejnych stadiów cyklu.

Przestrzenne i ilościowe analizy wybranego cyklu, ujawniły występowanie czterech stadiów, które charakteryzowały się odmienną dystrybucją oraz poziomem poliadenylowanego RNA (Ryc. 10, 11).

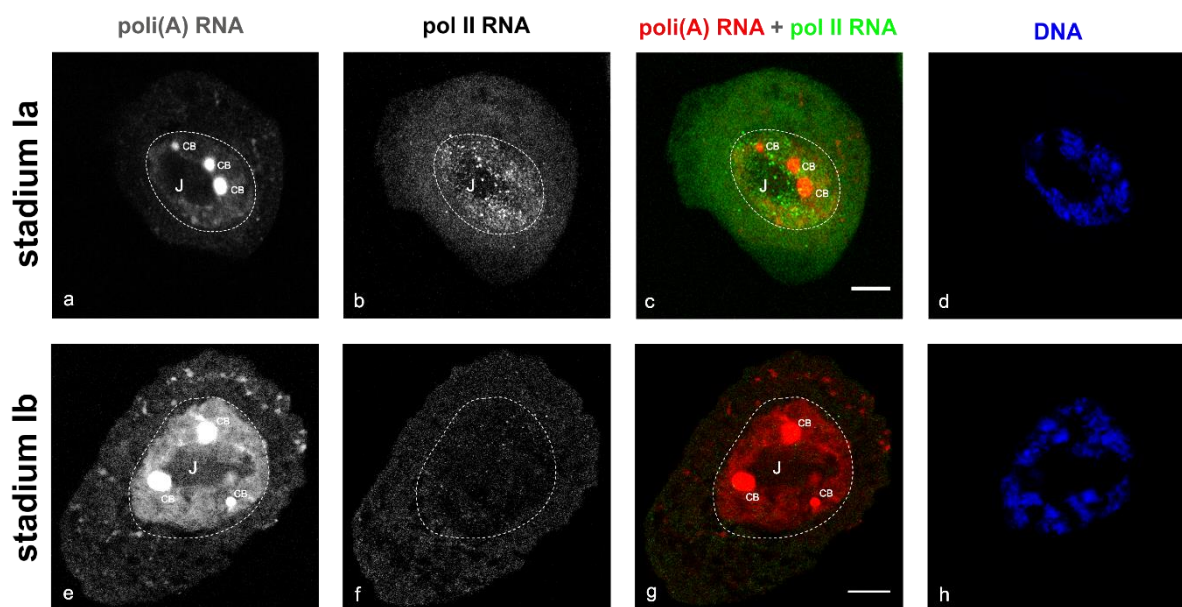


Ryc. 10 Przestrzenna dystrybucja poli(A) RNA w cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA. Szczegółowy opis w tekście. CB – ciało Cajala, J- jąderko. Skala 10 μ m.



Ryc. 11 Poziom jądrowego i cytoplazmatycznego poli(A) RNA w czterech kolejnych stadiach cyklu. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM).

W pierwszym stadium poli(A) RNA znajdowało się głównie na terenie jądra komórkowego, zarówno na terenie nukleoplazmy, jak i ciał Cajala (CB) (Ryc. 10A). Poziom poli(A) RNA na terenie jądra komórkowego w tym stadium był najwyższy podczas całego cyklu (Ryc. 11). Wysoki poziom poli(A) RNA skorelowany był z wysokim poziomem nowo zsyntetyzowanych transkryptów (Supl. 1a,b,c). Etap ten wskazuje na intensywną syntezę poliadenylowanego RNA *de novo*. Podwójne znakowanie poli(A) RNA oraz aktywnej formy polimerazy II RNA, ujawniło, iż podczas tego etapu cyklu można wyróżnić dwa wzorce dystrybucji aktywnej formy polimerazy II RNA (stadium Ia i Ib). Podczas stadium Ia (Ryc. 12a), wysoki poziom jądrowej puli poli(A) RNA skorelowany był z wysokim poziomem aktywnej formy polimerazy II RNA, co wskazuje na moment syntezy poli(A) RNA. Podczas stadium Ib (Ryc. 12b), poziom aktywnej polimerazy II RNA był niski, podczas gdy wzór lokalizacji poli(A) RNA pozostawał niezmienny. Sugeruje to, iż znaczna część nowo transkrybowanego poli(A) RNA nie jest natychmiast eksportowana do cytoplazmy, ale jest tymczasowo zatrzymana na terenie jądra komórkowego.



Ryc. 12 Lokalizacja aktywnej formy polimerazy II RNA w I stadium cyklu. CB- ciało Cajala, J- jąderko. Skala 10 μ m.

Podczas drugiego stadium cyklu poli(A) RNA nadal obserwowano na terenie nukleoplazmy i CB, natomiast pojawiły się również transkrypty na terenie cytoplazmy w strefie około jądrowej. Nagromadzenie poli(A) RNA wykazało charakterystyczny wzór, analogiczny do kształtu sieci retikulum endoplazmatycznego otaczającego jądro komórkowe. Z tego powodu wzór ten nazwano "podobnym do ER" (Ryc. 10B, powiększenie). Poziom poli(A) RNA na terenie jądra komórkowego zmniejszył się, natomiast zaobserwowano wzrost poziomu tych cząsteczek na terenie cytoplazmy (Ryc. 11). Począwszy od drugiego stadium cyklu poziom nowo powstałych transkryptów znacznie się zmniejszył i utrzymywał się na bardzo niskim poziomie aż do końca cyklu (Supl. 1).

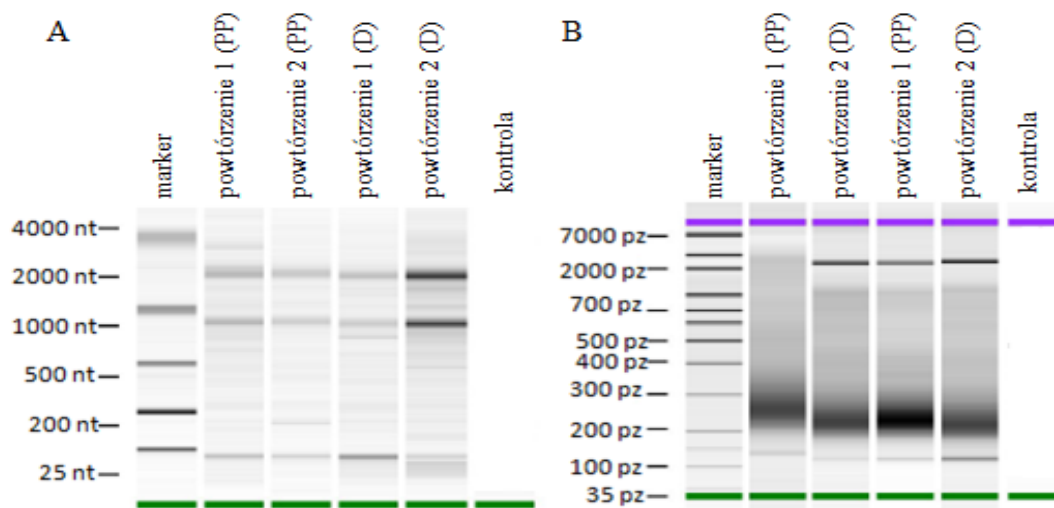
Podczas trzeciego stadium odnotowano bardzo duży spadek puli nukleoplazmatycznej poli(A) RNA, chociaż poli(A) RNA nadal obserwowano na terenie CB (Ryc. 10C). Spadek puli nukleoplazmatycznej związany był ze wzrostem poziomu transkryptów na terenie cytoplazmy (Ryc. 11). Wzór „podobny do ER” był nadal widoczny, chociaż był bardziej rozproszony w cytoplazmie w porównaniu z poprzednim stadium (Ryc. 10C).

Czwarte stadium charakteryzowało się najniższym poziomem puli poli(A) RNA w jądrze komórkowym, natomiast najwyższym w cytoplazmie (Ryc. 10D, 11). Nadal obserwowano

poli(A) RNA na terenie CB, natomiast na terenie cytoplazmy widoczne były liczne drobne skupiska, wypełniające całą jej objętość (Ryc. 10D).

6.2. Identyfikacja transkryptów mRNA ulegających syntezie w badanym okresie

Przeprowadzono analizę transkryptomu mikrosporocytów, w celu sprawdzenia jakie transkrypty są syntetyzowane w trakcie pojedynczego cyklu (IV) aktywności transkrypcyjnej. RNA izolowano w kilku powtórzeniach oraz użyto dwóch komercyjnie dostępnych zestawów odczynników (PicoPure RNA Isolation Kit, lub Direct-zol RNA Miniprep.). RNA poddano analizie jakościowej metodą elektroforezy kapilarnej. Analiza potwierdziła prawidłowy dla całkowitego RNA rozkład elektroforetyczny, z dwoma intensywnymi prążkami odpowiadającymi 18S oraz 25S rRNA w odpowiedniej proporcji (wskaźnik integralności RNA (RIN) = 8.0; Ryc. 13A). W próbie kontrolnej nie zarejestrowano żadnego sygnału. Po analizie jakościowej i ilościowej, otrzymane RNA posłużyło jako matryca do syntezy bibliotek cDNA do sekwencjonowania. Zastosowano dostępne komercyjnie zestawy odczynników Ribo-Zero Plant rRNA Removal Kit (Illumina) oraz Total RNA Seq Library Preparation Kit (Lexogen), przeznaczony do sekwenatora MiSeq (Illumina). Etapy przygotowania bibliotek obejmowały kolejno: deplecję rybosomalnego RNA, hybrydyzację starterów i stoperów, odwrotną transkrypcję i ligację, syntezę dwuniciowego cDNA, oczyszczanie, wzbogacenie bibliotek z wykorzystaniem PCR, oraz ponowne oczyszczanie (patrz Ryc. 8). Analiza jakościowa potwierdziła odpowiednią do sekwencjonowania jakość bibliotek. Obserwowano wzbogacenie cDNA w zakresie długości 200-300 pz (Ryc. 13B). Po walidacji ilościowej (qPCR z zastosowaniem systemu KAPA) oraz normalizacji, biblioteki poddano sekwencjonowaniu na aparaturze MiSeq (Illumina).

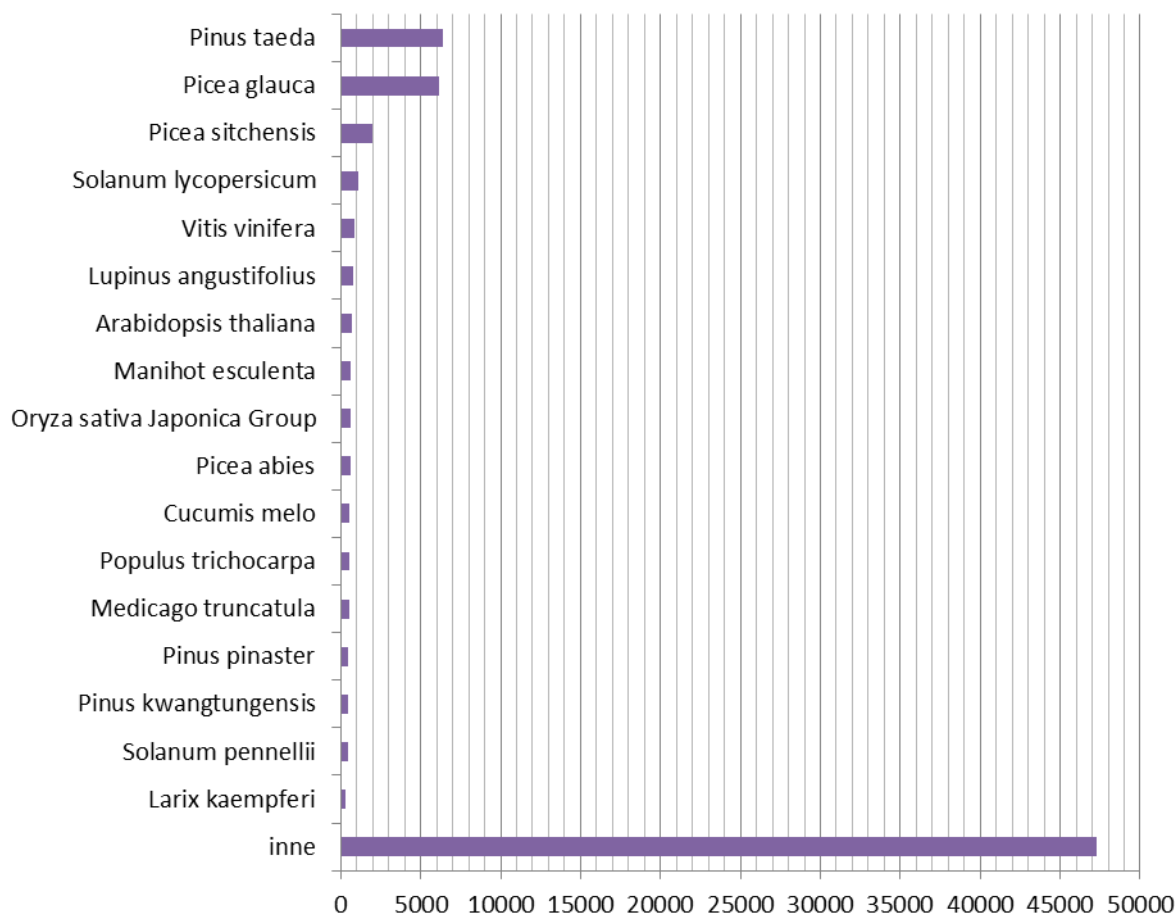


Ryc. 13 Analiza jakościowa RNA (A) i cDNA (B) podczas przygotowywania bibliotek do sekwencjonowania (szczegóły w tekście). PP – do izolacji RNA użyto PicoPure RNA Isolation Kit, D- do izolacji użyto Direct-zol RNA Miniprep. (B– biblioteki cDNA przygotowane na podstawie całkowitego RNA), Kontrola – H₂O.

W wyniku sekwencjonowania otrzymano 220400 sekwencji transkryptów. Długość otrzymanych sekwencji mieściła się w zakresie 120 - 7289 bp.

Wybrane sekwencje cDNA posłużyły jako dane wejściowe dla BLASTX (dla potencjalnych sekwencji mRNA) oraz BLASTN (dla pozostałych sekwencji) (przeszukiwano bazę danych (nr) NCBI dla roślin zielonych). Większość transkryptów wykazywało największą homologię do genów roślin z rodziny sosnowatych (*Pinaceae*, Ryc. 14): *Pinus taeda* (6397 transkryptów), *Picea glauca* (6128 transkrypty) oraz *Picea sitchensis* (2008 transkryptów).

Liczba wyników Blast



Ryc. 14 Analiza dystrybucji wyników BLAST pod względem gatunku. Wykres przedstawia liczbę najwyższych wyników BLAST dla analizowanych sekwencji u najczęściej przypisanych gatunków roślin.

Dalsze analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania BLAST2GO. Po zidentyfikowaniu sekwencji kodujących, wykonano analizę wzbogacenia i wybrano 1024 transkrypty mRNA, których poziom w badanym okresie był najwyższy (Supl. 2, płyta CD). Następnie rozpoczęto etap adnotacji funkcjonalnej wybranej grupy transkryptów, czyli przypisywania potencjalnym produktom genów ich funkcji przy pomocy terminologii GO (ang. *Gene Ontology*). 540 sekwencjom przypisano 214 112 terminów GO. W kategorii „proces biologiczny” największej liczbie transkryptów przypisano rolę w transkrypcji (2742), translacji (1903), tworzeniu mitochondriów (1570), metabolizmie związków azotu (1285), tworzeniu cytoszkieletu (1219), oraz fotosyntezie (1042). Terminy z kategorii „funkcja molekularna” obejmowały głównie aktywności enzymatyczne: hydrolazy (4494), ATPazy (1385) oraz transferazy (1340). Pozostałe terminy z tej grupy obejmowały aktywność

transportera transbłonowego (4557), oraz aktywność czynnika transkrypcyjnego (1026). Klasyfikacja pod względem lokalizacji w komórce (kategoria „kompartment komórkowy”) wykazała wzbogacenie w terminach takich jak białka: plastydów (4512), mitochondriów (2805), błonowe (2517), aparatu Golgiego (2439) czy retikulum endoplazmatycznego (1999).

proces biologiczny (GO)	liczba terminów GO
transkrypcja/transcription	2742
translacja/translation	1903
struktura mitochondriów/mitochondrion organization	1570
metabolizowanie związków azotu/nitrogen compound metabolic process	1285
struktura cytoszkieletu/cytoskeleton organization	1219
fotosynteza/photosynthesis	1042
fałdowanie białek/protein folding	744
przetwarzanie RNA/RNA processing	649
metabolizowanie białek/meprotein metabolic process	512
lokalizacja/localization	480
modyfikacja białek/protein modification process	428
odpowieź na bodziec/response to stimulus	425
potranskrypcyjne wyciszanie genów/posttranscriptional gene silencing	395
cykl komórkowy/cell cycle	383
metabolizowanie związków cyklicznych/organic cyclic compound metabolic process	256
metabolizowanie komórkowych związków aromatycznych/cellular aromatic compound metabolic process	255
ekspresja genów/gene expression	255
struktura plastydów/plastid organization	253
transport	238
metabolizowanie kwasów nukleinowych/nucleic acid metabolic process	236
proces utleniania i redukcji/oxidation-reduction process	223
metabolizowanie fosforu/phosphorus metabolic process	222
biosynteza amidów/amide biosynthetic process	216
biosynteza peptydów/peptide biosynthetic process	216
metabolizowanie kwasów karboksylowych/carboxylic acid metabolic process	213
metabolizowanie kwasów organicznych/organic acid metabolic process	213
proteoliza/proteolysis	213
fosforylacja/phosphorylation	212
transport transbłonowy/transmembrane transport	212
regulacja ekspresji genów/regulation of gene expression	209
odpowieź na stres/response to stress	209
transport jonów/ion transport	206

metabolizm mRNA/mRNA metabolic process	205
regulacja metabolizmu RNA/regulation of RNA metabolic process	205
biogeneza kompleksów rybonukleoprotein/ribonucleoprotein complex biogenesis	203
transport białek/protein transport	202
przetwarzanie mRNA/mRNA processing	200
splicing RNA/RNA splicing	192
potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów/posttranscriptional regulation of gene expression	158
transkrypcja mRNA/mRNA transcription	96
jądrowa retencja pre-mRNA w miejscu transkrypcji/nuclear retention of pre-mRNA at the site of transcription	61
inne	339807

funkcja molekularna (GO)	liczba terminów GO
aktywność hydrolazy/hydrolase activity	4494
aktywność transportera transbłonowego/transmembrane transporter activity	4557
aktywność ATPazy/ATPase activity	1385
aktywność transferazy/transferase activity	1340
aktywność czynnika transkrypcyjnego/transcription factor activity	1026
wiązanie rybonukleotydów/ribonucleotide binding	982
wiązanie nukleotydów/nucleotide binding	746
aktywność transportera/transporter activity	418
aktywność peptydazy/peptidase activity	380
aktywność katalazy/catalytic activity	357
wiązanie organicznych związków cyklicznych/organic cyclic compound binding	330
wiązanie związków heterocyklicznych/heterocyclic compound binding	329
wiązanie jonów/ion binding	290
wiązanie kwasów nukleinowych/nucleic acid binding	264
wiązanie małych molekuł/small molecule binding	257
wiązanie fosforanów nukleozydów/nucleoside phosphate binding	257
wiązanie anionów/anion binding	256
wiązanie pochodnych węglowodanów/carbohydrate derivative binding	251
wiązanie kationów/cation binding	236
wiązanie jonów metali/metal ion binding	233
wiązanie RNA/RNA binding	231
wiązanie białek/protein binding	231
wiązanie nukleozydów/nucleoside binding	229
wiązanie rybonukleozydów/ribonucleoside binding	227
aktywność oksydoreduktazy/oxidoreductase activity	220
wiązanie DNA/DNA binding	218
aktywność pirofosfatazy/pyrophosphatase activity	212

aktywność nukleozydo-trifosfatazy/nucleoside-triphosphatase activity	212
wiązanie purynowych rybonukleozydów/purine ribonucleoside binding	211
wiązanie purynowych nukleozydów/purine nucleoside binding	211
wiązanie kofaktorów/cofactor binding	206
aktywność liazy/lyase activity	205
wiązanie jonów metali przejściowych/transition metal ion binding	204
aktywność kinazy/kinase activity	203
aktywność ligazy/ligase activity	200
aktywność dimeryzacji białek/protein dimerization activity	199
wiązanie ATP/ATP binding	199
aktywność kinazy białek/protein kinase activity	196
wiązanie koenzymów/coenzyme binding	195
wiązanie lipidów/lipid binding	194
wiązanie białek cytoszkieletu/cytoskeletal protein binding	185
aktywność czynników translacyjnych, wiązanie RNA/translation factor activity, RNA binding	183
aktywność polimerazy RNA/RNA polymerase activity	173
wiązanie transkrypcyjnych regulatorów regionu DNA/transcription regulatory region DNA binding	157
wiązanie NAD/NAD binding	154
wiązanie miejsca splicingowego 3' pre-mRNA/pre-mRNA 3'-splice site binding	106
wiązanie snRNA/snRNA binding	102
inne	111889

komponent komórkowy (GO)	liczba terminów GO
plastyd/plastid	4512
mitochondrium/mitochondrion	2805
błona/membrane	2517
aparatus Golgiego/Golgi apparatus	2439
retikulum endoplazmatyczne/endoplasmic reticulum	1999
chromosom/chromosome	1817
cytoplazma/cytoplasm	1790
rybosom/ribosome	1637
jądro/nucleus	1462
cytoszkielet/cytoskeleton	1146
wakuola/vacuole	989
mikrotubule/microtubule	982
endosom/endosome	770
fotosystem/photosystem	747
peroksysom/peroxisome	636
region zewnątrzkomórkowy/extracellular region	580
chromatyna/chromatin	500

por jądrowy/nuclear pore	476
ściana komórkowa/cell wall	377
jąderko/nucleolus	346
lizosom/lysosome	169
filament aktynowy/actin filament	162
apoplast/apoplast	141
nukleosom/nucleosome	136
granule rybonukleoproteinowe/ribonucleoprotein granule	125
cytoplazmatyczne granule rybonukleoproteinowe/cytoplasmic ribonucleoprotein granule	125
P-body	121
plazmodesma/plasmodesma	115
symplast	115
centrosom/centrosome	108
ciała jądrowe/nuclear body	105
nukleoid/nucleoid	96
wrzeciono mitotyczne/mitotic spindle	94
polisom/polysome	86
amyloplast/amyloplast	85
cytoplazmatyczne granule stresowe/cytoplasmic stress granule	69
ciało Cajala/cajal body	65
etioplast	53
centriole	52
P granule	44
inne	45026

Ryc. 15 Adnotacja funkcjonalna mRNA.

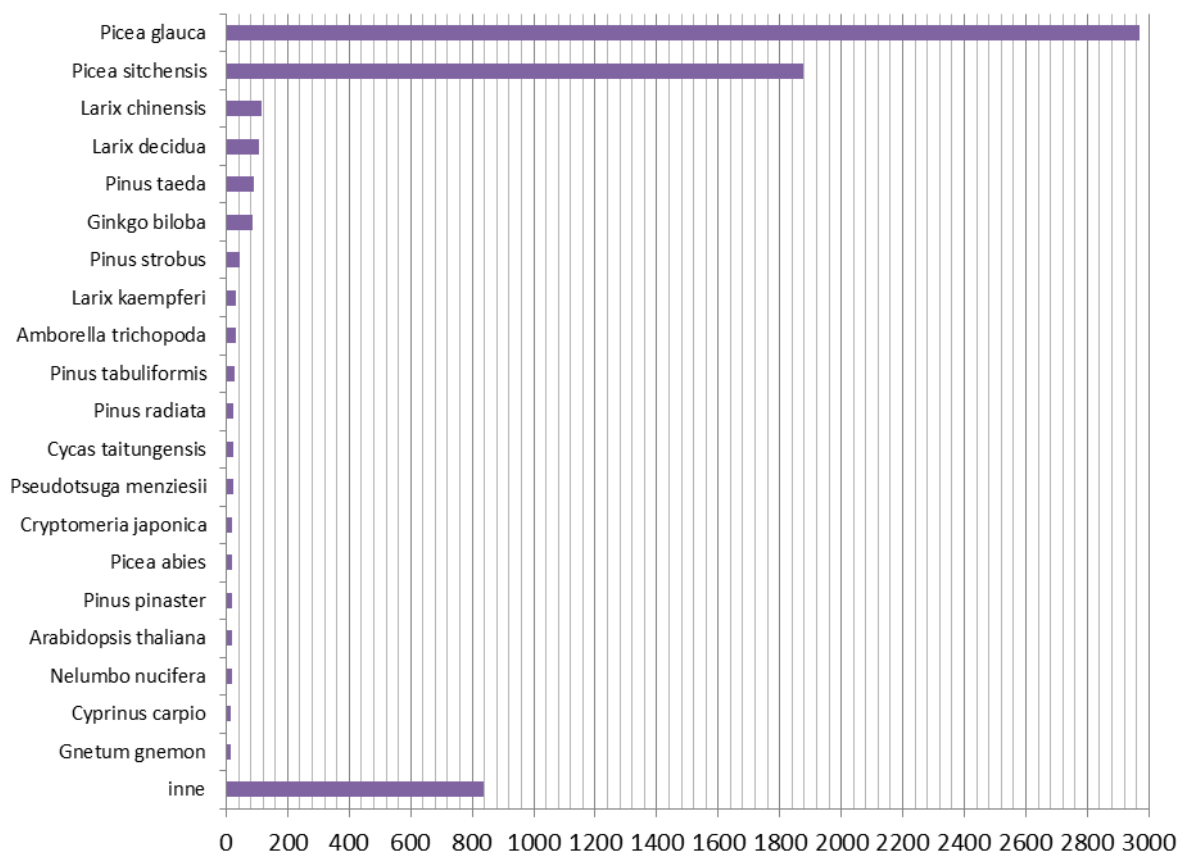
6.3. mRNA wykazują różny czas retencji na terenie jądra komórkowego

W celu sprawdzenia, które transkrypty są potencjalnie funkcjonalne i mogą ulegać translacji przeprowadzono analizę transkryptomu cytoplazmatycznego. Po izolacji czystej frakcji cytoplazmatycznej komórek pylnika, wyizolowane RNA podobnie jak przy wcześniejszej analizie transkryptomowej (patrz rozdział 6.2.) poddano analizie jakościowej metodą elektroforezy kapilarnej, która potwierdziła prawidłowy rozkład elektroforetyczny dla całkowitego RNA. Po analizie jakościowej i ilościowej, otrzymane RNA posłużyło jako matryca do syntezy bibliotek cDNA do sekwencjonowania. Zastosowano dostępny komercyjnie zestaw odczynników TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant (Illumina), przeznaczony dla sekwenatora MiSeq (Illumina). Etapy przygotowania bibliotek

cDNA obejmowały kolejno: deplecję rybosomalnego RNA, fragmentację RNA, odwrotną transkrypcję, syntezę dwuniciowego cDNA, adenylację końców 3', ligację adapterów TruSeq oraz wzbogacenie bibliotek (patrz Ryc. 9). Analiza jakościowa potwierdziła odpowiednią do sekwencjonowania jakość bibliotek. Obserwowano wzbogacenie cDNA w zakresie długości 300-500 pz. Po walidacji ilościowej (qPCR z zastosowaniem systemu KAPA) oraz normalizacji, biblioteki poddano sekwencjonowaniu na aparaturze MiSeq (Illumina).

W wyniku sekwencjonowania otrzymano 7001 sekwencji transkryptów znajdujących się na terenie cytoplazmy (Supl. 3, płyta CD). Długość otrzymanych sekwencji mieściła się w zakresie 200- 10795 bp. Większość złożonych odczytów obejmowała zakres 200 – 395 pz, co stanowiło 75% całkowitej puli. W celu identyfikacji transkryptów, otrzymane sekwencje zanalizowano za pomocą BLASTX (dla potencjalnych sekwencji mRNA) oraz BLASTN (dla pozostałych sekwencji) (przeszukiwano bazę danych (nr) NCBI dla roślin zielonych). Większość transkryptów wykazywało największą homologię do genów roślin z rodziny sosnowatych (*Pinaceae*, Ryc. 16): *Picea glaca* (2970 transkryptów), *Picea sitchensis* (1875), *Larix chinensis* (117), oraz *Larix decidua* (106).

liczba wyników BLAST



Ryc. 16 Analiza dystrybucji wyników BLAST pod względem gatunku mRNA znajdujących się na terenie cytoplazmy. Wykres przedstawia liczbę najwyższych wyników BLAST (ang. top BLAST hits) dla analizowanych sekwencji u najczęściej przypisanych gatunków roślin.

Dalsze analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania BLAST2GO. Po zidentyfikowaniu sekwencji kodujących rozpoczęto etap adnotacji funkcjonalnej, czyli przypisywania potencjalnym produktom genów ich funkcji przy pomocy terminologii GO (ang. *Gene Ontology*). 3283 sekwencjom (44%) przypisano łącznie 307 714 terminów GO. Analiza funkcjonalna wykazała, że cytoplazmatyczny transkryptom obejmował 5 głównych grup mRNA kodujących białka związanych z: (i) transkrypcją i procesami modyfikacji potranskrypcyjnej, (ii) rybosomami, translacją i modyfikacją potranslacyjną białek, (iii) mitochondriami i przemianami energetycznymi, (iv) fotosyntezą i plastydami, (v) cytoszkieletem i syntezą ściany komórkowej (Ryc. 17).

W kategorii „proces biologiczny” największej liczbie transkryptów w poszczególnych grupach przypisano rolę w metabolizowaniu nukleotydów (1621), metabolizowaniu białka (2 621), hydrolizie ATP (2849), fazie świetlnej fotosyntezy (586), oraz organizacji cytoszkieletu

(332). Transkrypty klasyfikowane pod względem funkcji molekularnej związane były z elementem strukturalnym rybosomu (1002), aktywnością dehydrogenazy NADH (1545), aktywnością polimeraz RNA (1949), wiązaniem chlorofilu (521), oraz wiązaniem tubuliny (304). Klasyfikacja transkryptów pod względem lokalizacji w komórce (kategoria „kompartment komórkowy”) wykazała, iż transkrypty kodowały głównie białka plastydów (8036), mitochondriów (6 368), błony (5 414) oraz cytoplazmy (3 790), czy rybosomów (2 996).

proces biologiczny (GO)	liczba terminów GO
Transkrypcja i procesy modyfikacji potranskrypcyjnej	25898
metabolizowanie nukleotydów/nucleotide metabolic process	1621
metabolizowanie rybonukleotydów/ribonucleotide metabolic process	1604
ekspresja genów/gene expression	1289
metabolizowanie kwasów nukleinowych/nucleic acid metabolic process	969
metabolizowanie RNA/RNA metabolic process	938
biosynteza nukleotydów/nucleotide biosynthetic process	792
przetwarzanie RNA/RNA processing	791
biosynteza rybonukleotydów/ribonucleotide biosynthetic process	781
splicing RNA/RNA splicing	565
regulacja ekspresji genów/regulation of gene expression	485
Rybosomy, translacja i modyfikacja potranslacyjna białek	14441
metabolizowanie białka/protein metabolic process	2621
metabolizowanie peptydu/peptide metabolic process	1091
translacja/translation	1084
biosynteza peptydu/peptide biosynthetic process	1084
modyfikacja białek/protein modification process	1526
biogeneza rybosomu/ribosome biogenesis	661

Mitochondria i przemiany energetyczne	12738
hydroliza ATP/ATP hydrolysis	2849
łańcuch transportu elektronów/electron transport chain	784
metabolizowanie ATP/ATP metabolic process	781
biosynteza ATP/ATP biosynthetic process	760
pozyskiwanie energii przez utlenianie związków organicznych/energy derivation by oxidation of organic compounds	757
oddychanie komórkowe/cellular respiration	755
montaż kompleksu cytochromu/cytochrome complex assembly	647
fosforylacja oksydacyjna/oxidative phosphorylation	460
organizacja mitochondriów/mitochondrion organization	318
transport mitochondrialny/mitochondrial transport	314
Fotosynteza i plastydy	5499
fotosynteza, faza świetlna/photosynthesis, light reaction	586
fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów/photosynthetic electron transport chain	495
metabolizowanie chlorofilu/chlorophyll metabolic process	475
biosynteza chlorofilu/chlorophyll biosynthetic process	445
fotosyntetyczny transport elektronów w fotosystemie I/photosynthetic electron transport in photosystem I	442
Cytoszkielec i synteza ściany komórkowej	3254
organizacja cytoszkieletu/cytoskeleton organization	332
organizacja ściany komórkowej/cell wall organization	633
biogeneza ściany komórkowej/cell wall biogenesis	622
organizacja mikrotubul cytoszkieletu/microtubule cytoskeleton organization	301
organizacja filamentów aktynowych/actin filament organization	281
Inne	302177

metabolizowanie związków azotu/nitrogen compound metabolic process	3217
lokalizacja/localization	1901
biosynteza komórkowych związków azotu/cellular nitrogen compound biosynthetic process	1320
metabolizowanie komórkowych amidów/cellular amide metabolic process	1101
biosynteza amidów/amide biosynthetic process	1091

funkcja molekularna (GO)	liczba terminów GO
Rybosomy, translacja i modyfikacja potranslacyjna białek	3178
element strukturalny rybosomu/structural constituent of ribosome	1002
aktywność czynnika translacyjnego, wiązanie RNA/translation factor activity, RNA binding	645
aktywność czynnika inicjacji translacji/translation initiation factor activity	612
aktywność peptydazy/peptidase activity	610
aktywność czynnika elongacji translacji/translation elongation factor activity	309
Mitochondria i przemiany energetyczne	3039
aktywność dehydrogenazy NADH/NADH dehydrogenase activity	1545
aktywność ATPazy/ATPase activity	773
aktywność oksydazy cytochromu-c/cytochrome-c oxidase activity	365
Transkrypcja i procesy modyfikacji potranskrypcyjnej	3016
aktywność polimerazy RNA/RNA polymerase activity	1949
aktywność regulatora transkrypcji/transcription regulator activity	384
aktywność czynnika transkrypcyjnego wiążącego DNA/DNA-binding transcription factor activity	376
aktywność koregulatora transkrypcji/transcription coregulator activity	307
Fotosynteza i plastydy	905

wiązanie chlorofilu/chlorophyll binding	521
transporter elektronów, przenoszenie elektronów w cyklicznym szlaku transportu elektronów podczas aktywności fotosyntetycznej/electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity	384
Cytoszkielec i synteza ściany komórkowej	606
wiązanie tubuliny/tubulin binding	304
wiązanie aktyny/ actin binding	302
Inne	145527
aktywność transportera transbłonowego/transmembrane transporter activity	7005
aktywność hydrolazy/hydrolase activity	2854
aktywność katalityczna/catalytic activity	2446
wiązanie pochodnych węglowodanów/carbohydrate derivative binding	2365

komponent komórkowy (GO)	liczba terminów GO
plastyd/plastid	8036
mitochondrium/mitochondrion	6368
błona/membrane	5414
cytoplazma/cytoplasm	3790
rybosom/ribosome	2996
jądro/nucleus	2277
chromosom/chromosome	2174
retikulum endoplazmatyczne/endoplasmic reticulum	1867
cytoszkielec/cytoskeleton	1624
aparatus Golgiego/Golgi apparatus	944
wakuola/vacuole	901

mikrotubula/microtubule	866
endosom/endosome	791
region zewnątrzkomórkowy/extracellular region	632
jąderko/nucleolus	577
chromatyna/chromatin	361
nukleosom/nucleosome	354
ściana komórkowa/cell wall	296
peroksysom/peroxisome	294
apoplast	284
por jądrowy/nuclear pore	257
inne	82727

Ryc. 17 Adnotacja funkcjonalna mRNA znajdujących się na terenie cytoplazmy.

Przeprowadzono analizę przestrzenną lokalizacji mRNA *in situ* w cyklu, aby zweryfikować, czy wszystkie mRNA z głównych grup transkryptów obecne na terenie cytoplazmy, należą do transkryptów ulegających retencji na terenie jądra komórkowego, a następnie eksportowi na teren cytoplazmy. Spośród transkryptów uzyskanych podczas analizy transkryptomu cytoplazmatycznego mikrosporocytów, wybrano 15, które reprezentowały główne klasy mRNA pod względem funkcjonalnym oraz ilościowym, po analizie wzbogacenia. Dla wybranych mRNA zaprojektowano specyficzne sondy oligonukleotydowe. Następnie wykorzystując zaprojektowane sondy wykonano reakcję fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w celu zbadania zmian dystrybucji wybranych transkryptów podczas cyklu. Wśród badanych transkryptów obecne były mRNA kodujące białka związane z **fotosyntezą i plastydami**: białko wiążące chlorofil a-b (LHCP, Ryc. 21I-L), plastydowa polimeraza RNA (PEP, Ryc. 21A-D), **transkrypcją i procesami modyfikacji potranskrypcyjnej**: podjednostka 10 polimerazy II RNA (RPB10, Ryc. 18A-D), białka Sm (Ryc. 18E-H), białko wiążące ogon poli(A) 4 (PABP4, Ryc. 20M-P), **rybosomami, translacją i modyfikacją potranslacyjną białek**: białko małej podjednostki rybosomowej S6 (RS6, Ryc. 20R-U), czynnik inicjacji translacji 5b (eIF5b, Ryc. 20E-H), czynnik elongacji translacji 1a (EF1a, Ryc. 21R-U),

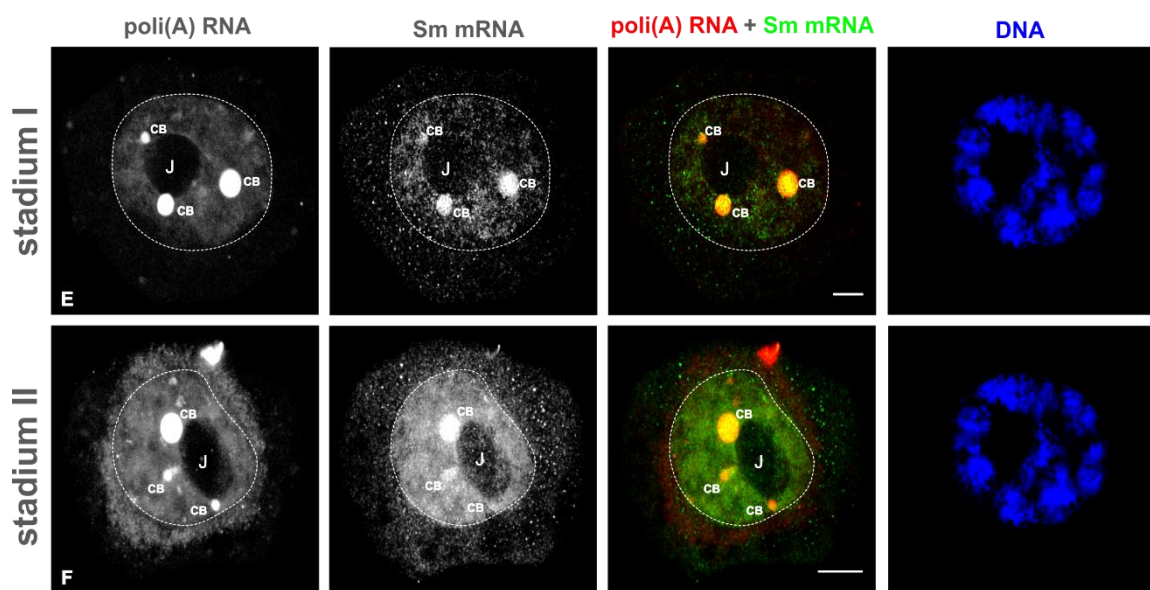
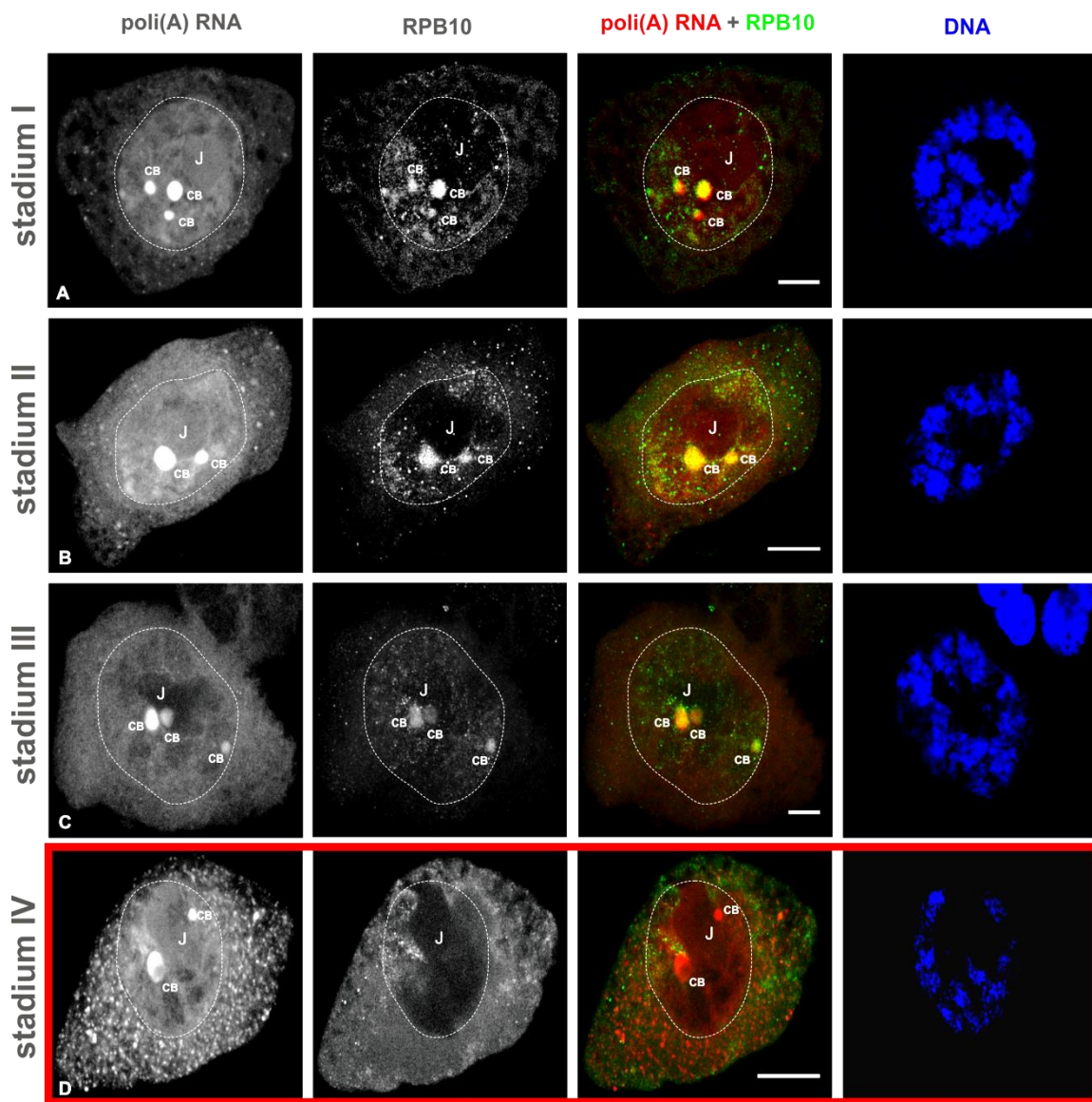
mRNA białek uczestniczących w fałdowaniu- białko z domeną DNaj (DNJ, Ryc. 19I-L). Ponadto, mRNA związane z **mitochondriami i przemianami energetycznymi**: podjednostka 7 dehydrogenazy NADH (NAD7, Ryc. 21M-P), dehydrogenaza bursztynianowa (SDH, Ryc. 20E-H), oraz mRNA związanych z **cytoszkieletem i syntezą ściany komórkowej**: aktyna (ACT, Ryc. 19A-D) i tubulina (TBA, Ryc. 20I-L), białek zewnątrzkomórkowych związanych z metabolizmem ściany komórkowej- perkosydaza 40 (PER40, Ryc. 20A-D), a także mRNA kodujące celulazę (CELL2, Ryc. 21E-H).

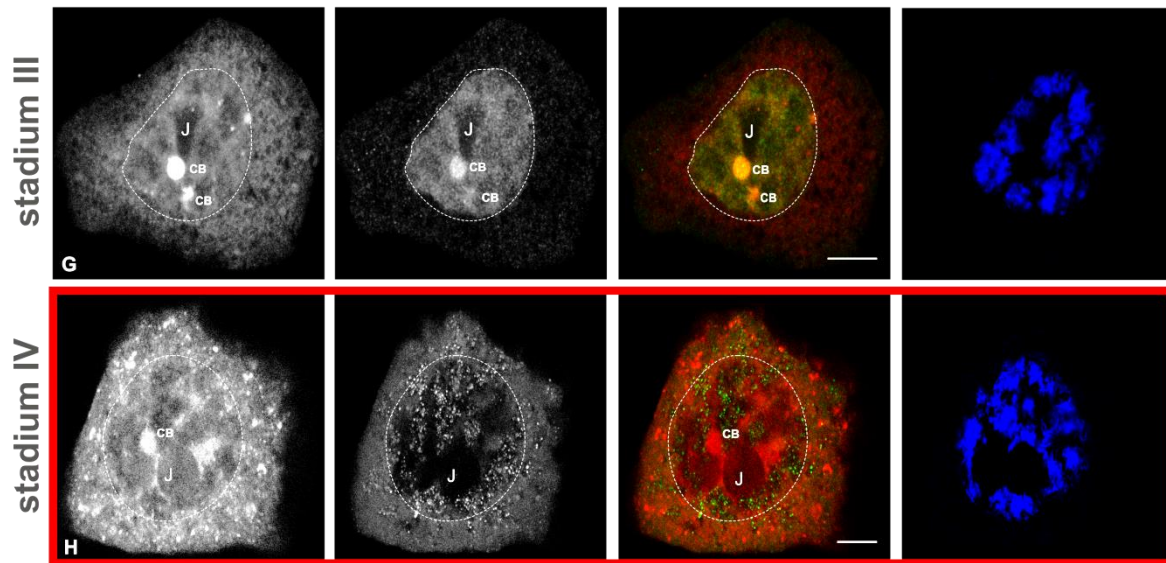
Analiza dystrybucji mRNA wykazała, że w mikrosporocytach *Larix decidua* czas retencji mRNA na terenie jądra komórkowego jest różny dla różnych transkryptów. Biorąc pod uwagę kryterium czasu retencji na terenie jądra oraz stadium cyklu w której mRNA pojawia się na terenie cytoplazmy wyróżniono trzy grupy transkryptów: (1) transkrypty, których poziom jądrowy jest wysoki przez większość cyklu, a pojawianie się transkryptów w cytoplazmie następuje pod koniec cyklu (długoretencyjne), (2) transkrypty, których retencję na terenie jądra obserwowano do I/II stadium, a w II/III stadium poziom transkryptów w cytoplazmie wzrastał (krótkoretencyjne), (3) transkrypty, których poziom jądrowy i cytoplazmatyczny od początku cyklu był porównywalny (nieretencyjne).

Transkrypty długoretencyjne

Do pierwszej grupy transkryptów należały mRNA związane z transkrypcją i procesami modyfikacji potranskrypcyjnej: mRNA podjednostki 10 polimerazy II RNA (RPB10) oraz mRNA białek Sm (Sm mRNA, Ryc. 18). mRNA RPB10 oraz Sm mRNA gromadziły się, aż do III stadium na terenie jądra komórkowego przy niewielkim transporcie do cytoplazmy (Ryc. 18A-C, E-G). mRNA widoczne było w tych stadiach w formie rozproszonej na terenie nukleoplazmy, lokalizowane było także na terenie ciał Cajala (CB) (Ryc. 18A-C, E-G). Dopiero podczas IV stadium mRNA (RPB10, Sm) widoczne było głównie na terenie cytoplazmy.

Otrzymane wyniki wskazują, że wzór zmian dystrybucji długoretencyjnych mRNA jest podobny do przebiegu zmian dystrybucji ogólnej puli poliadenylowanych transkryptów. W początkowych stadiach poziom transkryptów w jądrze komórkowym jest wyższy niż na terenie cytoplazmy, pomimo transportu już w drugim stadium transkryptów na teren cytoplazmy.



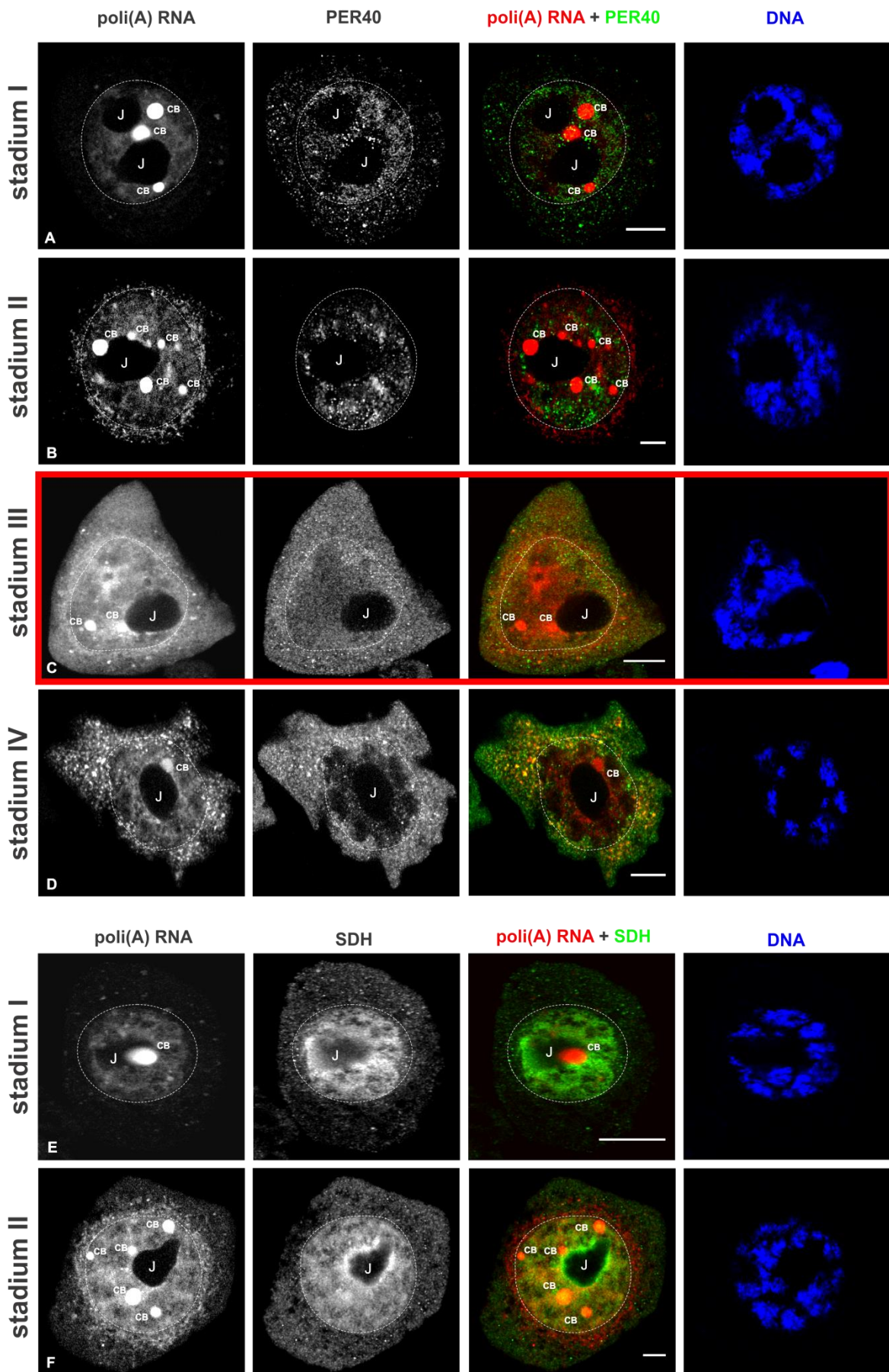


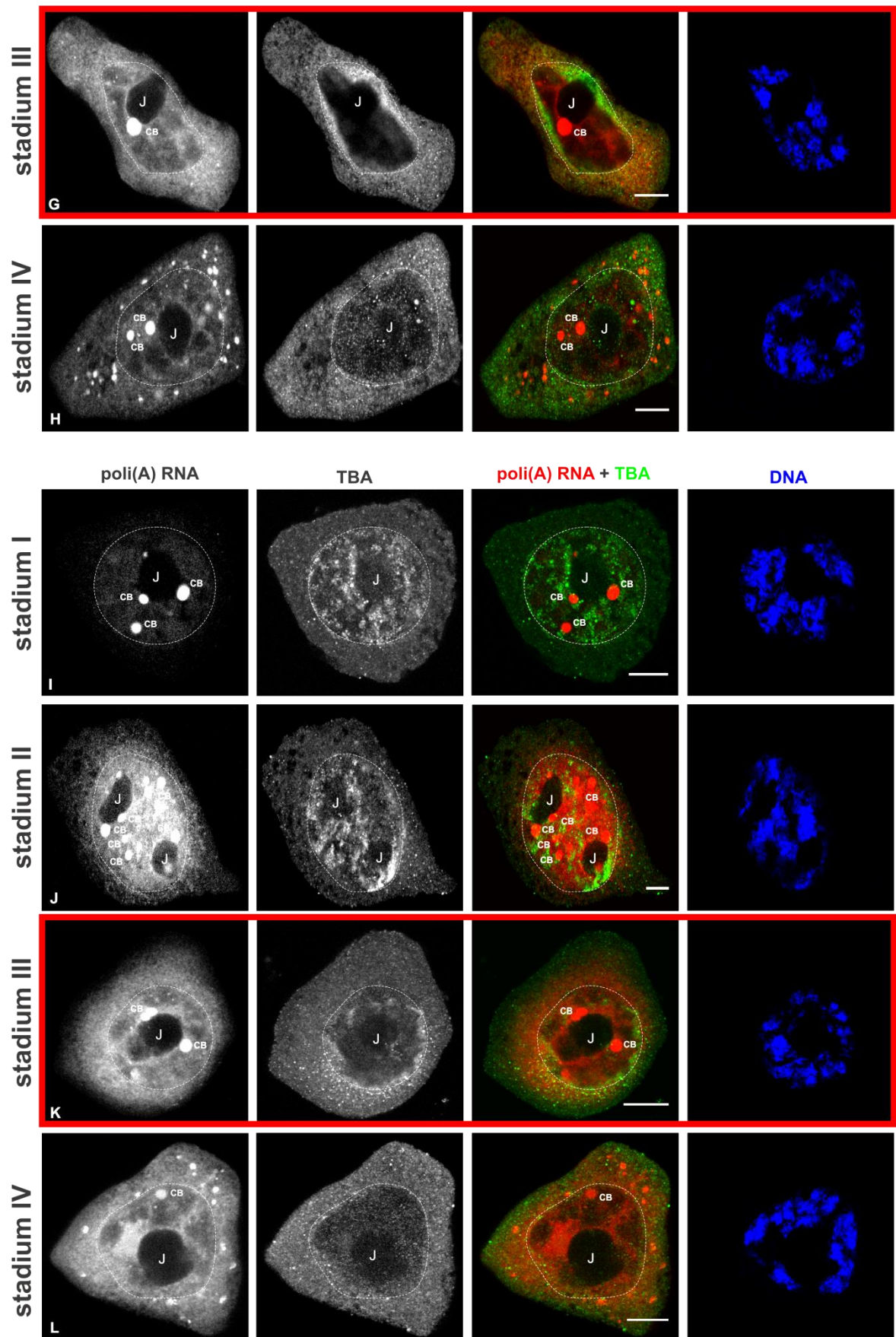
Ryc. 18 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA długoretencyjnych podczas cyklu. Podczas I stadium cyklu mRNA podjednostki 10 polimerazy II RNA (RPB10) oraz mRNA białek Sm obserwowane były głównie na terenie jądra komórkowego (Ryc. 18A, E). mRNA widoczne było w formie rozproszonej na terenie nukleoplazmy, lokalizowane było także duże nagromadzenie na terenie ciał Cajala (CB) (Ryc. 18A, E). W kolejnych dwóch stadiach cyklu (II-III) nadal obserwowano wysoki poziom transkryptów zarówno na terenie nukleoplazmy, jak i ciał Cajala (Ryc. 18B-C, F-G). Podczas trwania ostatniego stadium cyklu (IV) transkrypty widoczne są głównie na terenie cytoplazmy, niewielka ilość widoczna jest na terenie jądra komórkowego (Ryc. 18D, H). Czerwoną ramką oznaczono stadium, w którym obserwujemy znaczący wzrost poziomu mRNA w cytoplazmie. RPB10- podjednostka 10 polimerazy II RNA, Sm mRNA- białka Sm, CB – ciało Cajala, J- jąderko. Skala 10 μm .

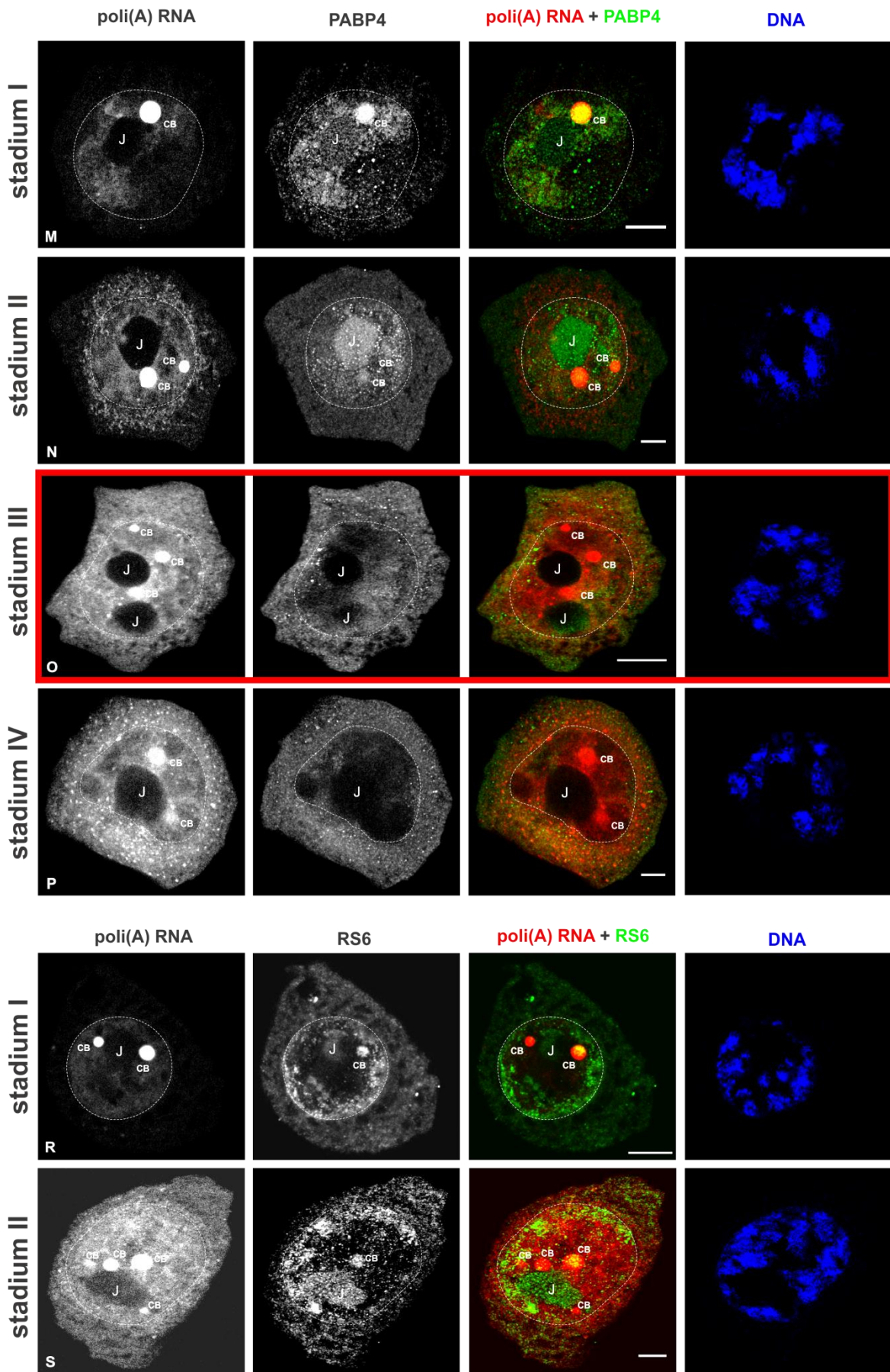
Transkrypty krótkoretencyjne

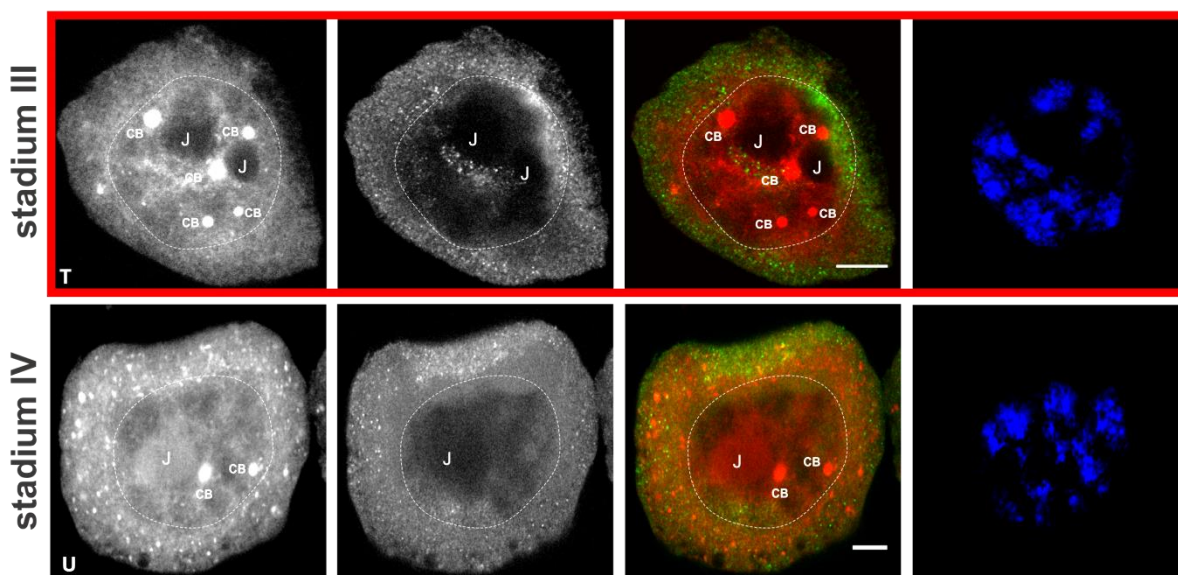
Drugą grupę transkryptów stanowiły mRNA kodujące białka związane z (i) cytoszkieletem i syntezą ściany komórkowej: aktyna (ACT, Ryc. 20A-D), peroksydaza 40 (PER40, Ryc. 19A-D) i tubulina (TBA, Ryc. 19I-L); (ii) rybosomami, translacją oraz modyfikacją potranslacyjną białek: czynnik inicjacji translacji 5b (EIF5b, Ryc. 20E-H), białko z domeną DNaj (DNJ, Ryc. 20I-L) i białko małej podjednostki rybosomowej S6 (RS6, Ryc. 19R-U); (iii) mRNA związane z mitochondriami i przemianami energetycznymi: dehydrogenazy bursztynianowej (SDH, Ryc. 19E-H); oraz z (iv) transkrypcją i procesami modyfikacji potranskrypcyjnej: białko wiążące ogon poli(A) 4 (PABP4, Ryc. 19M-P).

Wśród transkryptów krótkoretencyjnych można wyróżnić dwie grupy: (A) transkrypty, które gromadziły się na terenie jądra komórkowego do II stadium (Ryc. 19C,G,K,O,T) oraz (B) transkrypty, które gromadziły się na terenie jądra komórkowego tylko w I stadium (Ryc. 20B, F,J). Niektóre z transkryptów podczas początkowych stadiów cyklu (I i II) widoczne były na terenie ciał jądrowych: CB (Ryc. 19M-N,R-S, 20I-J), oraz jąderka (Ryc. 19M-N,R-S, 20E,I).

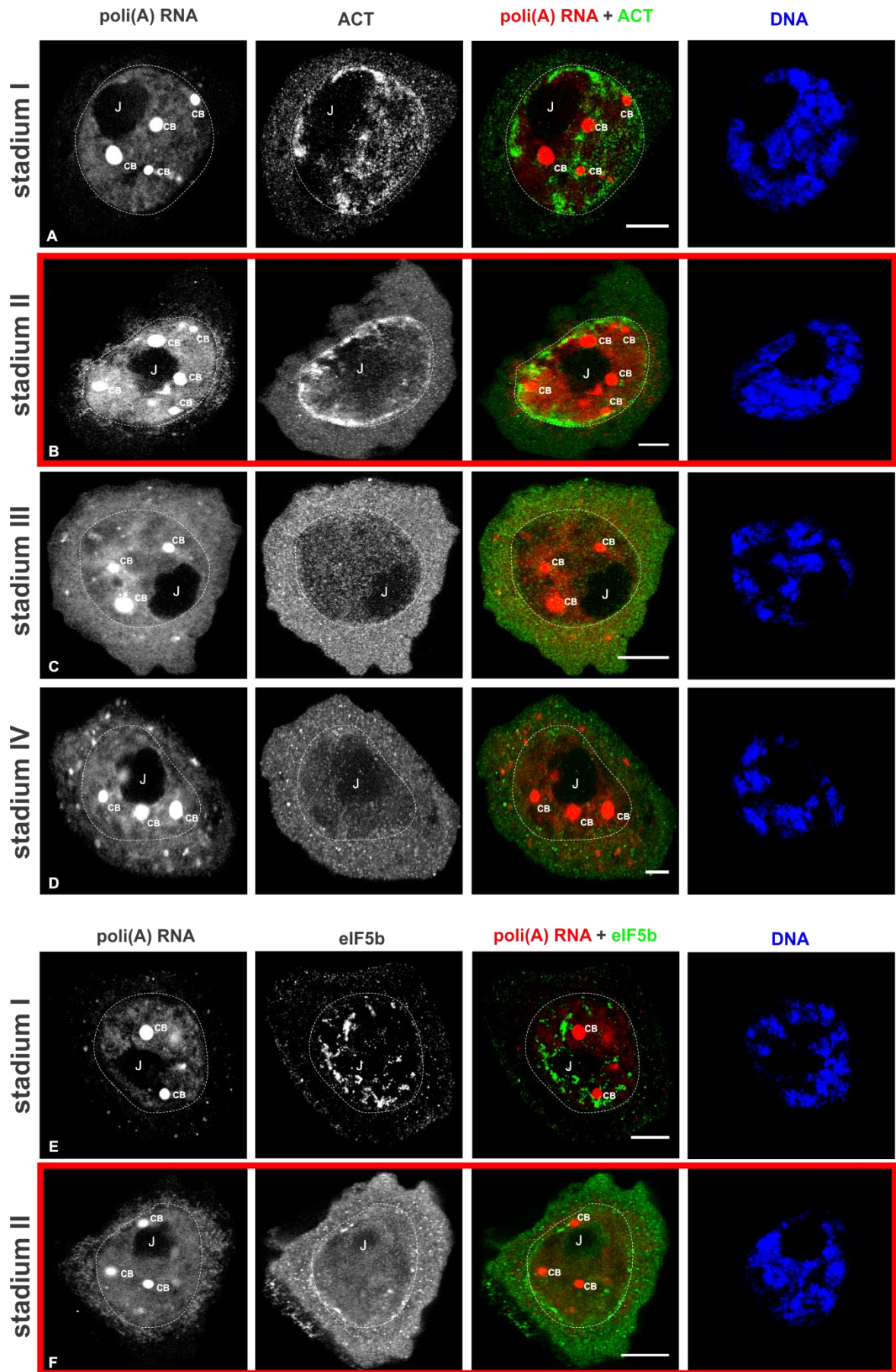


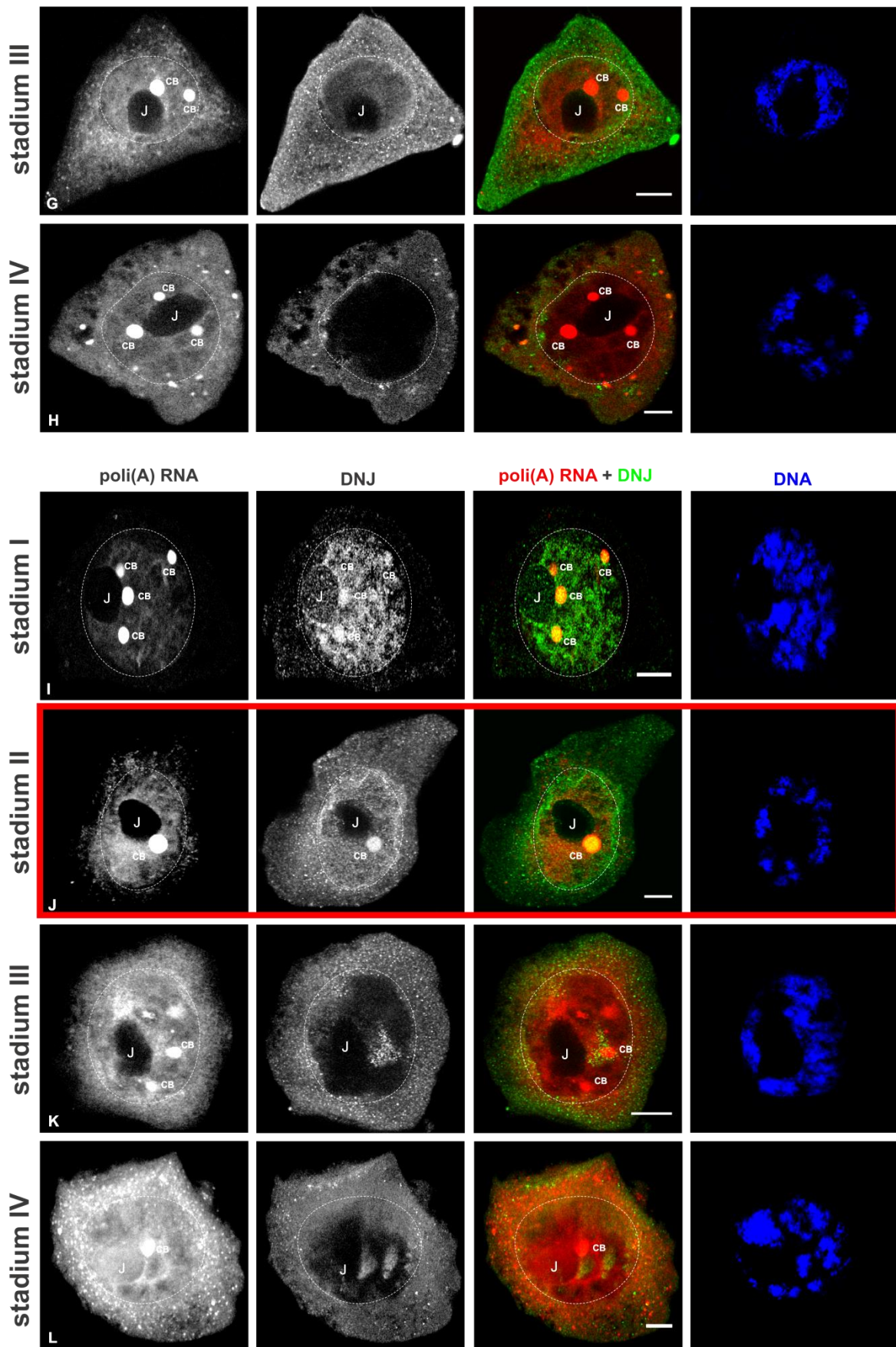






Ryc. 19 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA krótkoretencyjnych (retencja w I i II stadium-A) w cyklu. Podczas I stadium cyklu mRNA obserwowano głównie na terenie jądra komórkowego (Ryc. 19A,E,I,M,R). Niektóre z transkryptów widoczne były na terenie domen jądrowych: ciało Cajala (Ryc. 19M,R), oraz jąderka (Ryc. 19M,R). W II stadium transkrypty widoczne były nadal głównie na terenie jądra komórkowego (Ryc. 19B,F,J,N,S), oraz na terenie ciał jądrowych: CB, oraz jąderka (Ryc. 19N,S). W kolejnych dwóch stadiach cyklu (III i IV) mRNA obserwowano głównie na terenie cytoplazmy (Ryc. 19C,D,G,H,K,L,O,P,T,U). Niewielkie nagromadzenie widoczne było na terenie nukleoplazmy, brak mRNA na terenie domen jądrowych. Czerwoną ramką oznaczono stadium, w którym obserwujemy znaczący wzrost poziomu mRNA w cytoplazmie. PER40- peroksydaza 40, SDH- dehydrogenaza bursztynianowa, TBA- tubulina, PABP4- białko wiążące poli(A) 4, RS6- białko małej podjednostki rybosomowej S6, CB – ciało Cajala, J- jąderko. Skala 10 μm .

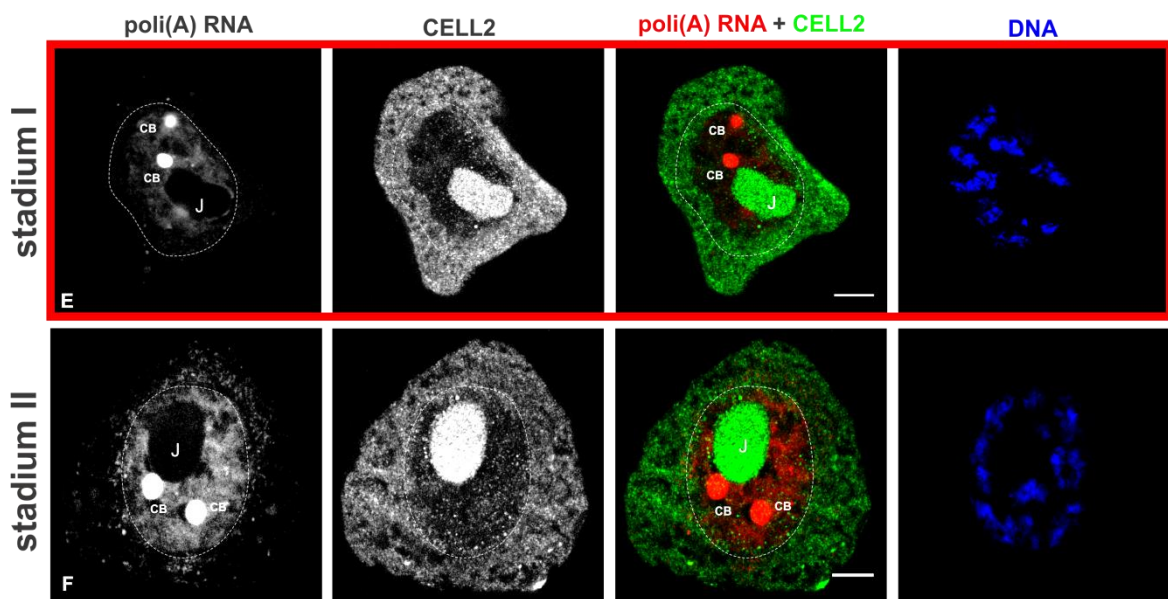
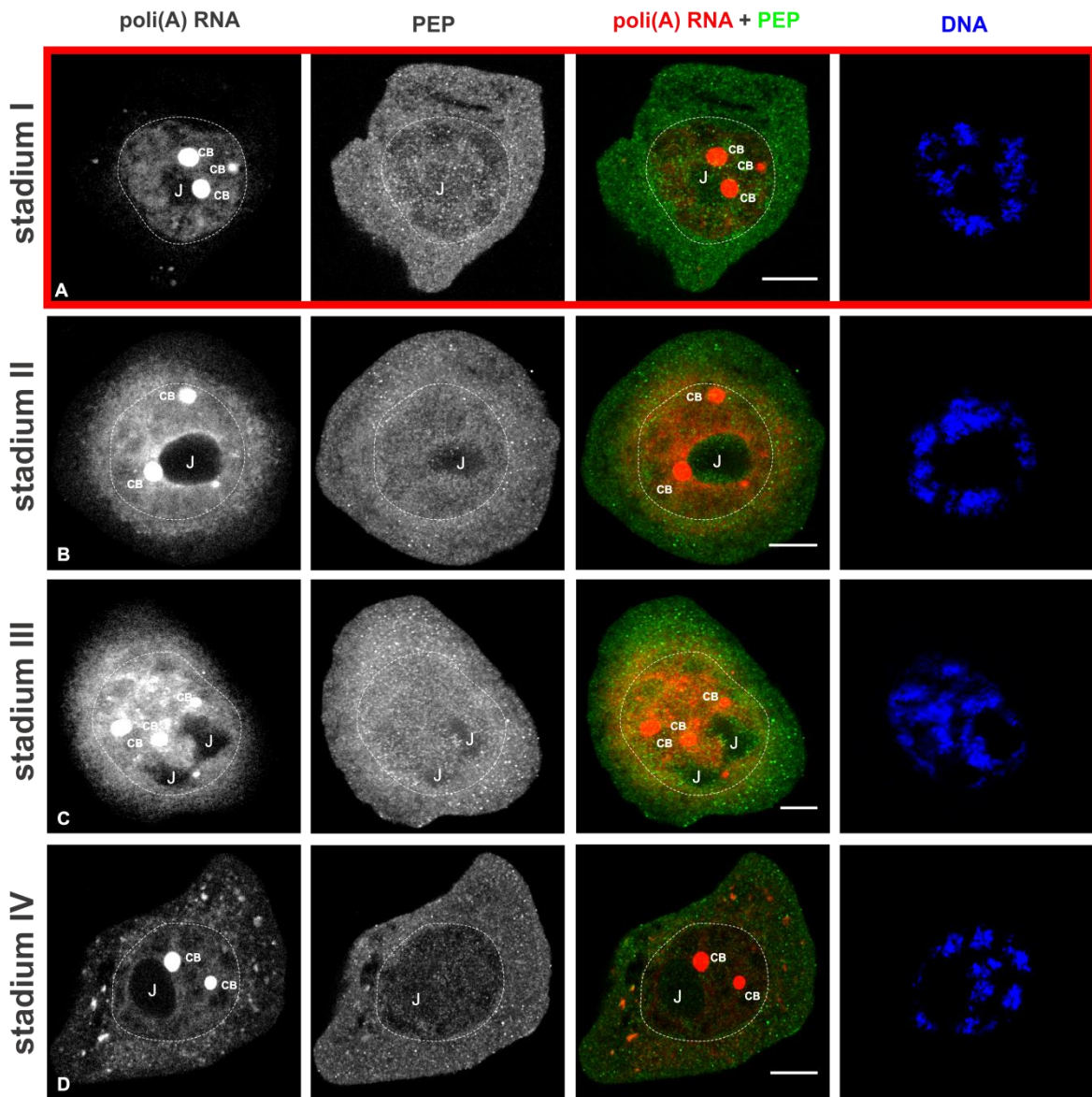


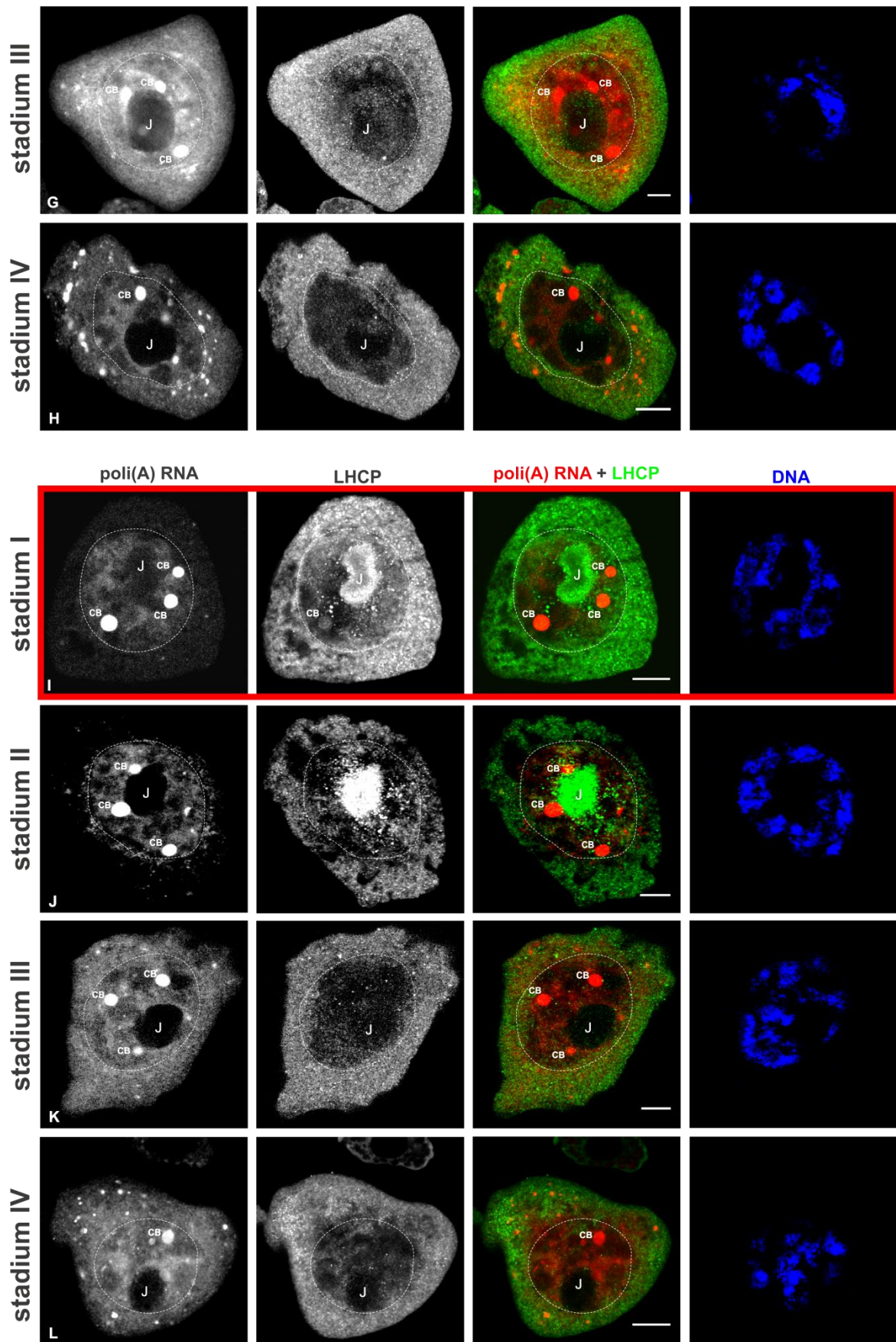


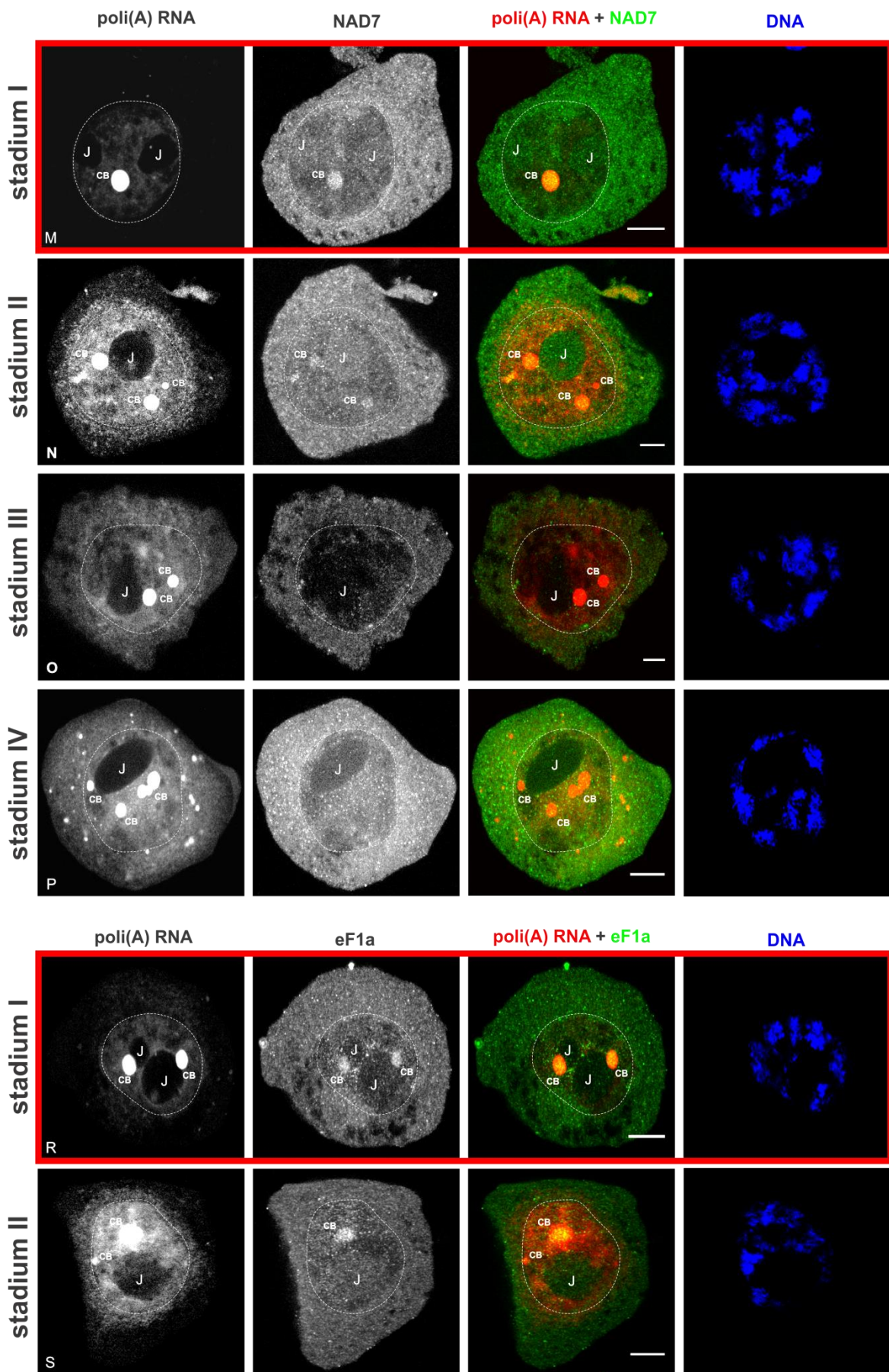
Ryc. 20 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA krótkoretencyjnych (retencja w I stadium- B) w cyklu. Podczas I stadium mRNA obserwowano głównie na terenie jądra komórkowego (Ryc. 20A,E,I). Niektóre z transkryptów widoczne były na terenie ciał jądrowych: CB (Ryc. 20I), oraz jąderka (Ryc. 20E,I). W II stadium cyklu transkrypty widoczne były przy otoczce jądrowej, a także na terenie cytoplazmy (Ryc. 20B,F,J). mRNA DNJ nadal obserwowano na terenie CB (Ryc. 20J). W kolejnych dwóch stadiach cyklu (III i IV) mRNA obserwowano głównie na terenie cytoplazmy (Ryc. 20C,D,G,H,K,L). Niewielkie nagromadzenie widoczne było na terenie nukleoplazmy, brak mRNA na terenie domen jądrowych. Czerwoną ramką oznaczono stadium, w którym obserwujemy znaczący wzrost poziomu mRNA w cytoplazmie. ACT- aktyna, eIF5b- czynnik inicjacji translacji 5b, DNJ- białko z domeną DNaJ, CB – ciało Cajala, J- jąderko. Skala 10 μm.

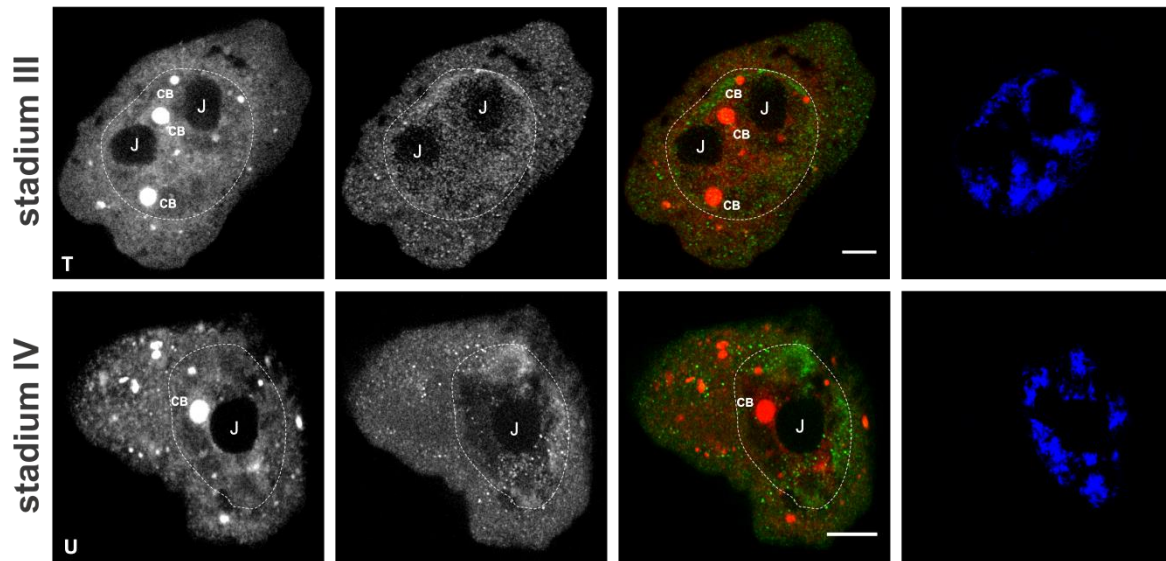
Transkrypty nieretencyjne

Trzecią grupę transkryptów stanowiły mRNA kodujące białka związane z (i) fotosyntezą i plastydami: plastydowa polimeraza RNA (PEP), białka wiążącego chlorofil a-b (LHCP); (ii) cytoszkieletem i ścianą komórkową: celuloza (CELL2); (iii) mitochondriami i przemianami energetycznymi: podjednostka 7 dehydrogenazy NADH (NAD7); oraz (iv) rybosomami, translacją i modyfikacjami potranslacyjnymi białek: czynnik elongacji translacji 1a (eIF1a). Transkrypty te nie gromadziły się w dużej ilości na terenie jądra komórkowego i już podczas trwania pierwszego stadium cyklu, widoczne były na terenie cytoplazmy na podobnym poziomie (Ryc. 21A,E,I,M,R). Obserwowano je także w jąderku (Ryc. 21A,E,I,M), a także niektóre z nich w CB (Ryc. 21M,R). Otrzymane wyniki wskazują, iż transkrypty należące do tej grupy nie ulegają retencji na terenie jądra komórkowego i zaraz po syntezie transportowane są do cytoplazmy.









Ryc. 21 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA nieretencyjnych w cyklu. Podczas I stadium mRNA widoczne było na terenie jądra komórkowego oraz cytoplazmy (Ryc. 21A,E,I,M,R). Transkrypty widoczne były także na terenie ciał jądrowych: jąderka (Ryc. 21A,E,I,M), a także niektóre z nich na terenie CB (Ryc. 21M,R). Podczas kolejnych stadiów cyklu (II-IV) mRNA nadal obserwowano zarówno na terenie jądra komórkowego, jak i cytoplazmy (Ryc. 21B-D, F-H, J-L, N-P, S-U), a także akumulację na terenie jąderka (Ryc. 21F,J,N,S) oraz CB (Ryc. 21N,S). Czerwoną ramką oznaczono stadium, w którym obserwujemy znaczący wzrost poziomu mRNA w cytoplazmie. PEP- plastydowa polimeraza RNA, CELL2- celulaza, LHCP- białko wiążące chlorofil a-b, NAD7- podjednostka 7 dehydrogenazy, eF1a- czynnik elongacji translacji 1a, CB – ciało Cajala, J- jąderko.

Skala 10 μ m.

6.4. mRNA ulegające retencji na terenie jądra komórkowego to funkcjonalne mRNA ulegające translacji

Jak sugerują dane literaturowe retencja mRNA na terenie jądra komórkowego może mieć dwa podłoża. Retencji mogą ulegać wadliwe transkrypty, które nie przechodzą pozytywnie kontroli jakości i ulegną degradacji, bądź transkrypty prawidłowe, których eksport z różnych przyczyn jest wstrzymywany. Z tego względu podjęto się weryfikacji, czy retencyjne mRNA obserwowane w mikrosporocytach modrzewia są transkryptami prawidłowymi, na bazie

których powstaną funkcjonalne białka. W tym celu przeanalizowano pojedynczy cykl ekspresji genów kodujących białka Sm: od syntezy i dystrybucji długoretencyjnego mRNA w komórce, aż do translacji białka i jego importu do jądra.

Wcześniejsze badania wykazały, że w mikrosporocytach modrzewia białka Sm podobnie jak poli(A) RNA ulegają cyklicznej ekspresji, w pięciu cyklach syntezy (Hyjek i wsp. 2015). Każdy z tych cykli związany jest z biogenezą splicingowych U snRNP, a zmiany dystrybucji białek Sm odzwierciedlają kolejne etapy powstawania/funkcjonowania cząsteczek UsnRNP w mikrosporocytach modrzewia. Wykorzystując wcześniej opisany model dystrybucji białek Sm w poszczególnych etapach biosyntezy kompleksów snRNP, będzie możliwa ocena funkcjonalności retencyjnych transkryptów kodujących białka Sm.

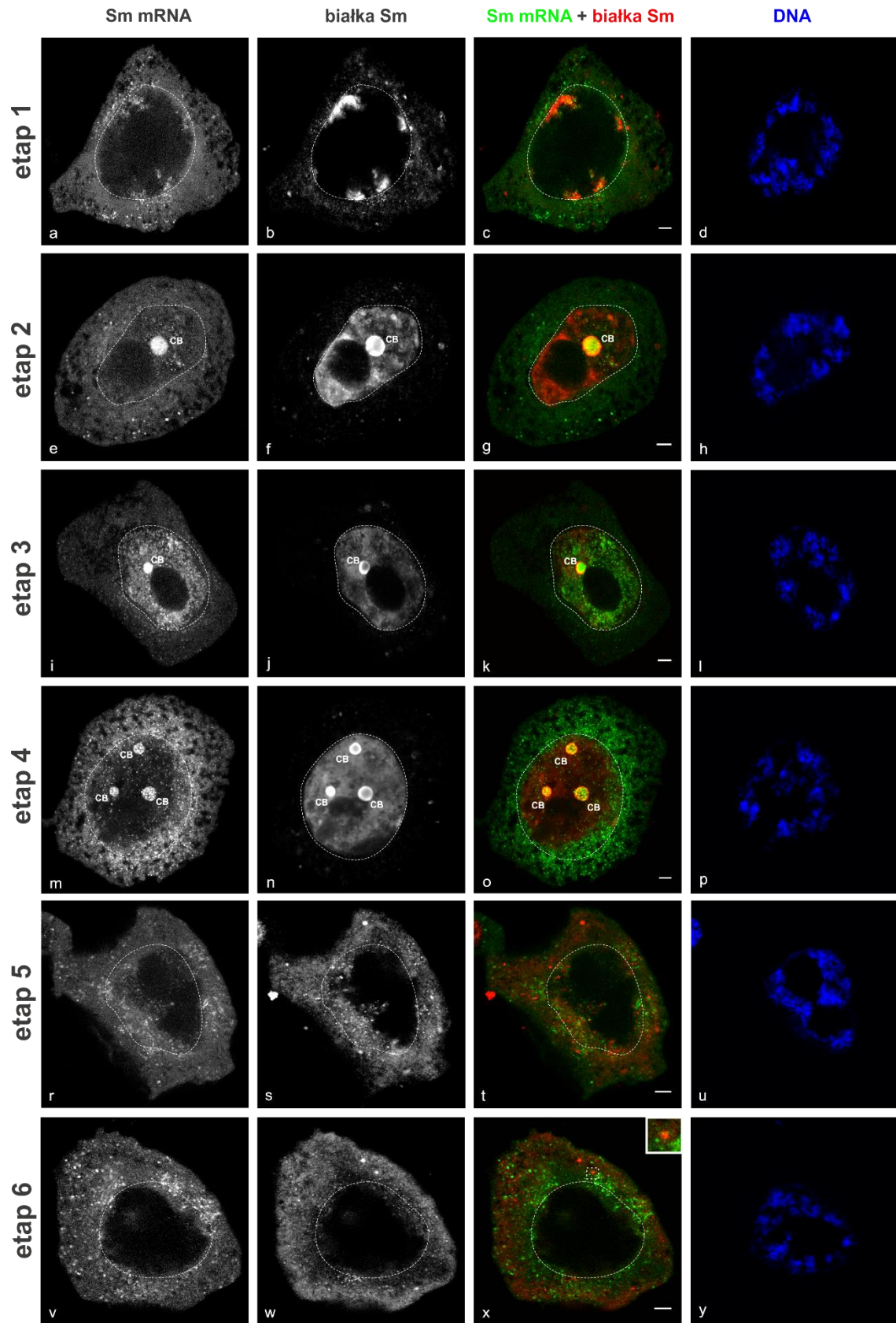
Do analizy wybrano jeden z cykli biogenezy UsnRNP (patrz rozdział 2.4.), który składał się z sześciu kolejnych etapów. Wykonana została analiza dystrybucji mRNA kodujących białka Sm w korelacji z ich produktami białkowymi w komórce.

Podczas pierwszego etapu transkrypty mRNA białek Sm zlokalizowane były w licznych skupiskach, głównie przy otoczce jądrowej, zarówno po stronie cytoplazmatycznej, jak i jądrowej (Ryc. 22a). Białka Sm zlokalizowane były w nukleoplazmie, przy otoczce jądrowej (Ryc. 22b). Prawdopodobnie podczas tego etapu dochodzi do syntezy mRNA *de novo* oraz jądrowego importu białek Sm powstałych w poprzedniej rundzie ekspresji Sm.

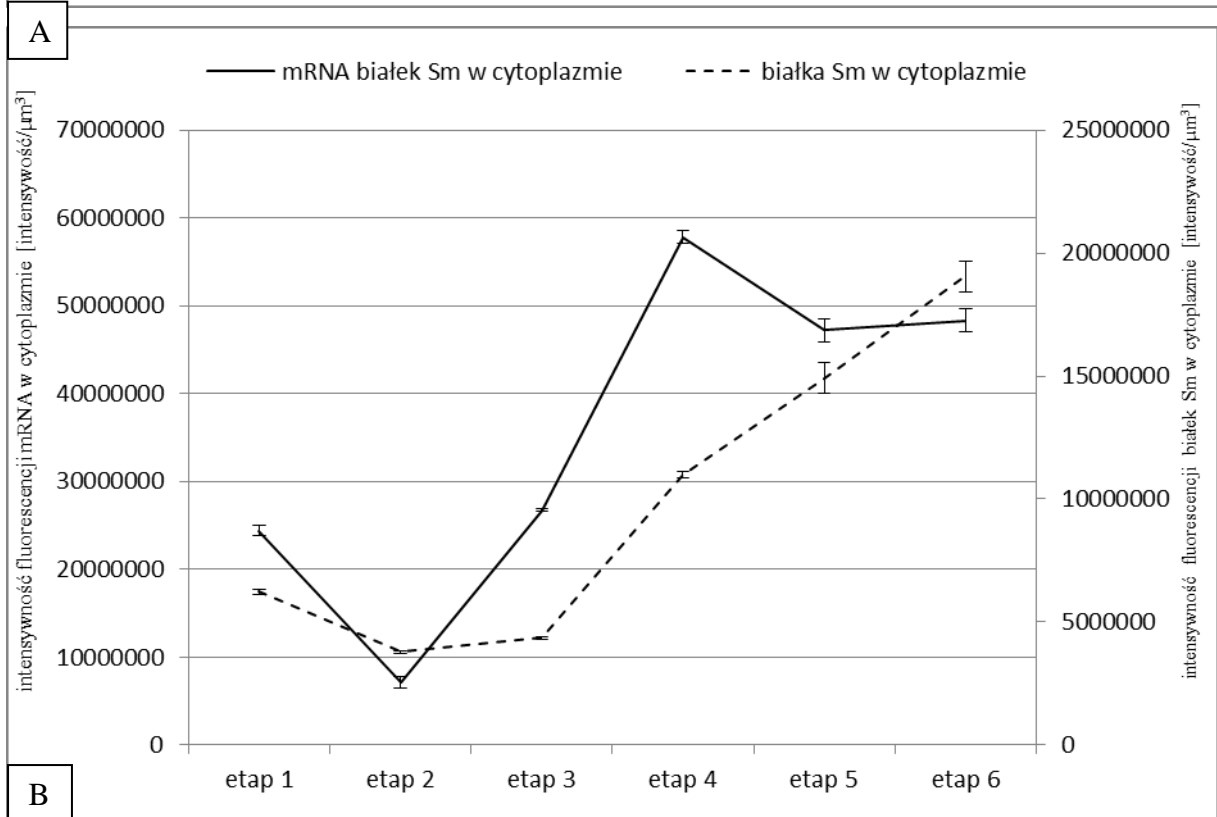
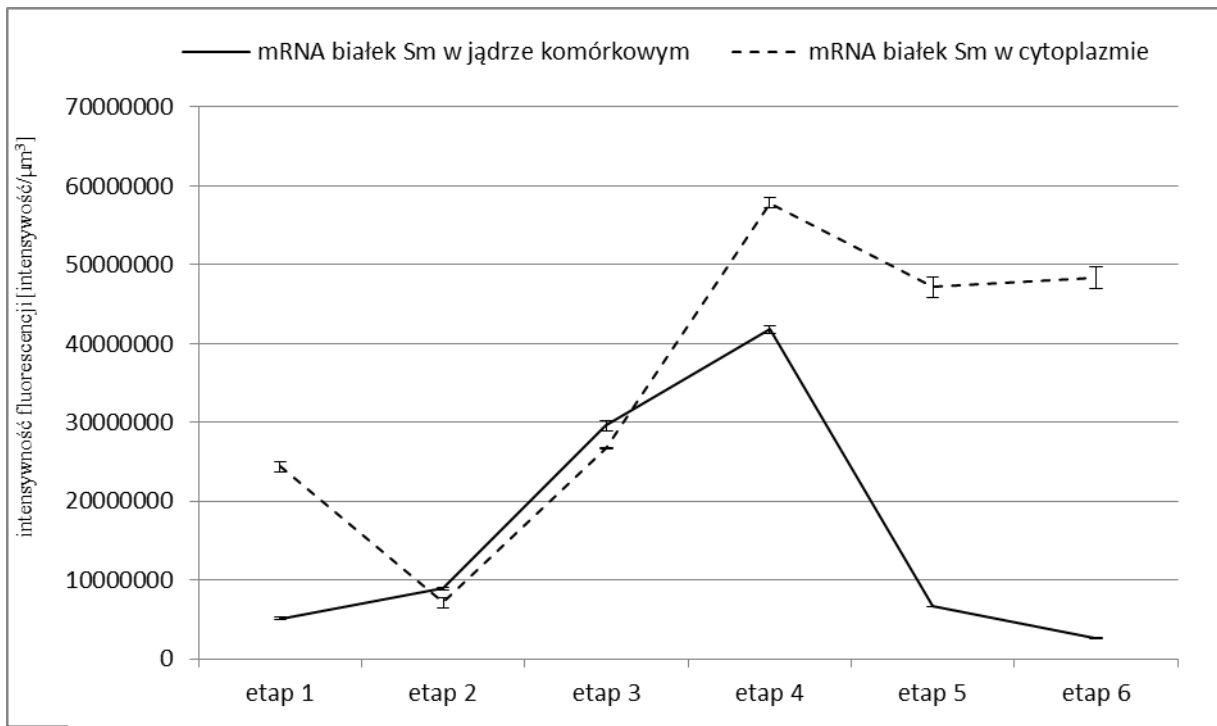
Podczas trzech kolejnych etapów nastąpił stopniowy wzrost jądrowej puli mRNA białek Sm (Ryc. 22d-1). Podczas drugiego etapu na terenie CB widoczne były zarówno mRNA białek Sm, jak i białka Sm (Ryc. 22d,e).

Wzrost ilości mRNA białek Sm w cytoplazmie odnotowano podczas trzeciego etapu (Ryc. 23A), który koreluje ze wzrostem ilości białek Sm w tym kompartmentie komórkowym (Ryc. 23B). Otrzymane wyniki mogą wskazywać na translację transportowanych na teren cytoplazmy mRNA.

Wysoki poziom cytoplazmatyczny obu molekuł występował, aż do końca cyklu.



Ryc. 22 Analiza dystrybucji mRNA białek Sm w kolokalizacji z białkowym produktem- białkami Sm. Odnotowano wysoką akumulację mRNA w jądrze komórkowym, które następnie eksportowane jest do cytoplazmy, gdzie może ulegać translacji. CB- ciała Cajala

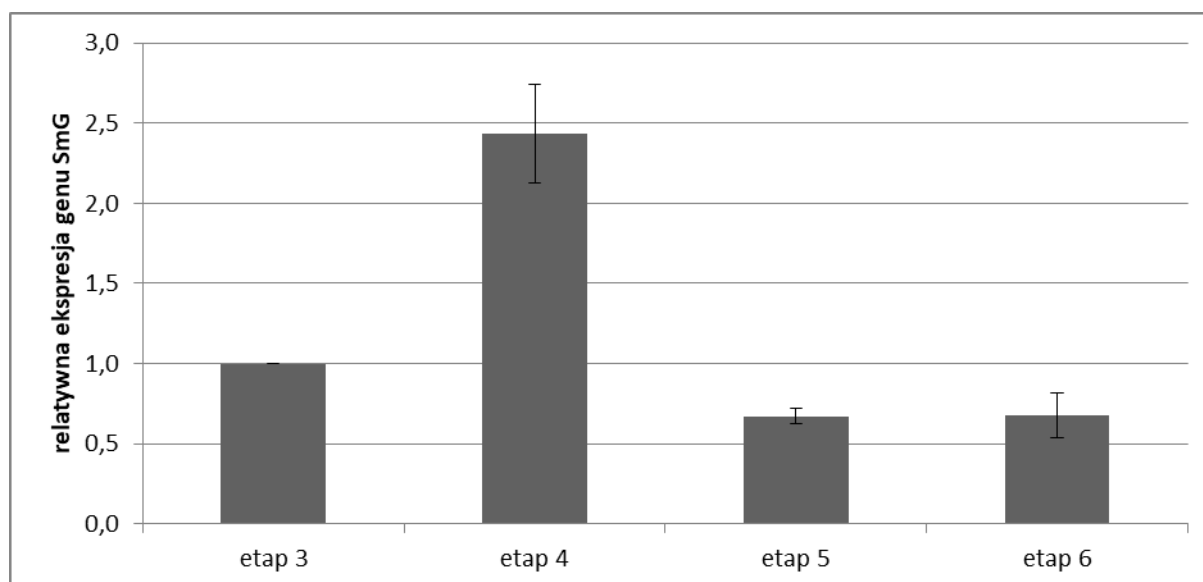


Ryc. 23 (A) Analiza ilościowa poziomu jądrowego i cytoplazmatycznego mRNA kodujący białka Sm w mikrosporocytach modrzewia podczas diplotenu, (B) Analiza korelacji pomiędzy transportem mRNA do cytoplazmy, a syntezą białka. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM).

Podczas gdy mRNA białek Sm były eksportowane do cytoplazmy, gromadziły się w licznych skupieniach na terenie cytoplazmy, często kolokalizujących lub będących w bliskim sąsiedztwie akumulacji białek Sm (Ryc. 22x, powiększenie). Ten wzór lokalizacji wskazuje na proces syntezy białek Sm.

Podczas etapu szóstego, poziom białek Sm w cytoplazmie osiągnął najwyższy poziom podczas całego cyklu biogenezy (Ryc. 23B).

Dodatkowo przeprowadziliśmy analizę poziomu ekspresji jednego z mRNA kodującego białka Sm- SmG wykonaną za pomocą metody qPCR podczas poszczególnych etapów biogenezy UsnRNP wykazała, że najwyższy poziom ekspresji SmG mRNA (Ryc. 24) koreluje z najwyższym poziomem ogólnej puli mRNA kodującego białka Sm mierzonej na podstawie ilościowego FISH.



Ryc. 24 Poziom ekspresji mRNA kodującego białka Sm (SmG) mierzony metodą qPCR. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej (SEM). Faza 3-6 kolejne etapy biogenezy snRNP.

Uzyskane dane wskazują, że w mikrosporocytach modrzewia, transkrypty, które ulegają retencji są transkryptami funkcjonalnymi, które ulegają translacji. Wskazywać może to na występowanie mechanizmu, który czasowo zatrzymuje transkrypty na terenie jądra komórkowego, aby w późniejszym czasie uległy eksportowi oraz translacji na terenie cytoplazmy.

6.5. mRNA ulegają retencji jako pre-mRNA

Badania dotyczące jądrowej retencji mRNA wskazują, że ma ona znaczący wpływ na regulację ekspresji genów, poprzez regulację eksportu i opóźnienie translacji, co pozwala na syntezę określonych białek w ściśle kontrolowanym czasie lub warunkach.

Dotychczasowe badania przeprowadzone na komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych wykazały, iż mRNA ulegające retencji na terenie jądra komórkowego może mieć różną formę dojrzałości. mRNA mogą ulegać retencji zarówno jako pre-mRNA (z zachowanym jednym lub kilkoma intronami), lub w formie dojrzałej.

Dlatego kolejnym krokiem w scharakteryzowaniu badanego w niniejszej pracy zjawiska retencji mRNA na terenie jądra komórkowego było określenie w jakiej formie dojrzałości mRNA ulega retencji. W tym celu wykonano analizę dystrybucji pre-mRNA kodującego białka SmG, D1 i D2 oraz pre-mRNA jednej z podjednostek polimerazy II RNA- RPB10, które należały do grupy transkryptów długoretencyjnych. Przeprowadzone wcześniej badania ujawniły, że geny białek SmG i SmD2 zawierają 3 introny, natomiast SmD1 i RPB10 2 introny. Zaprojektowano specyficzne sondy oligonukleotydowe do pre-mRNA zawierającego sekwencje intronowe wyżej wymienionych mRNA, a następnie, dla każdej z sond wykonano reakcję fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) wraz z kolokalizacją poli(A) RNA (Ryc. 25).

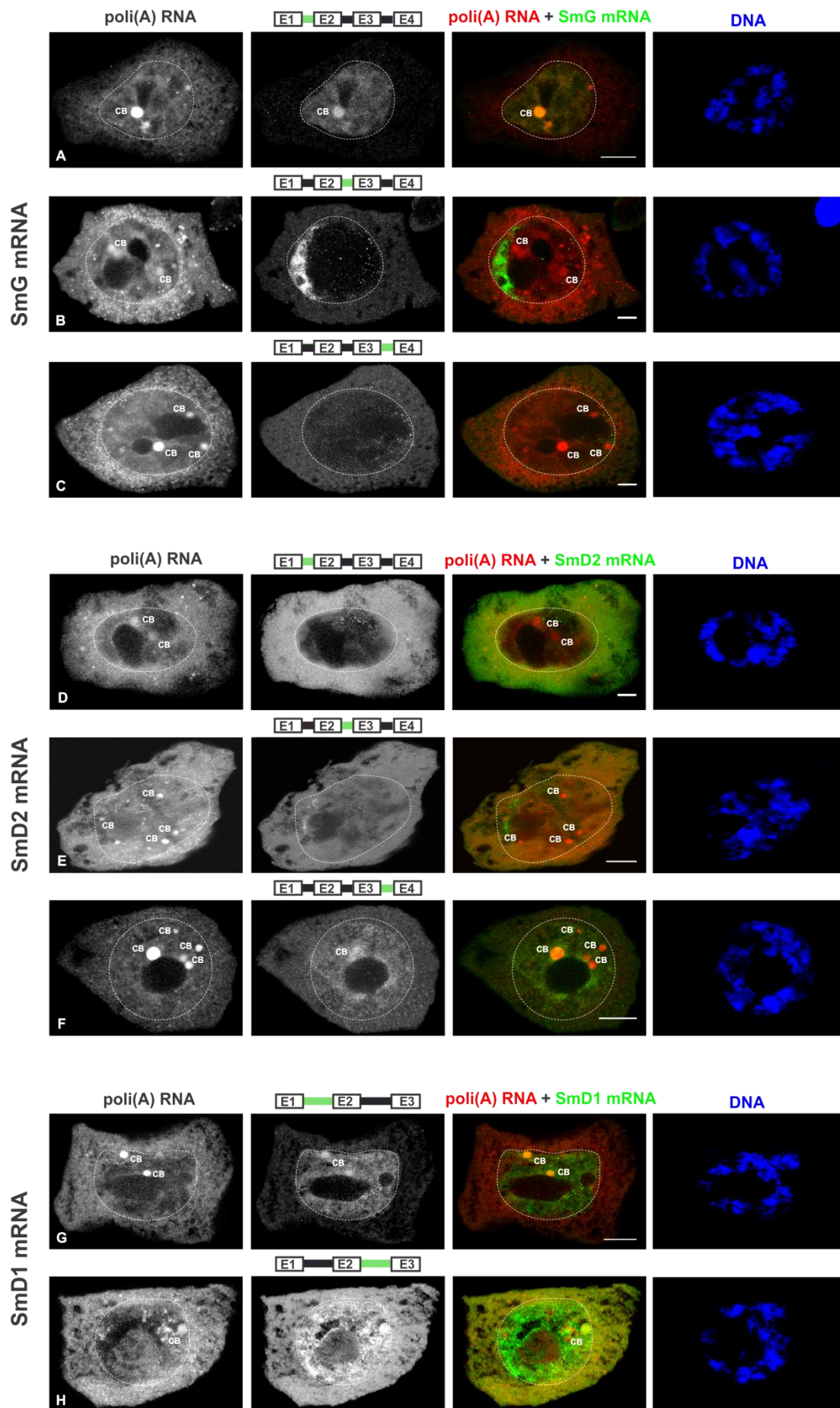
Analiza wykazała, iż mRNA należące do grupy transkryptów długoretencyjnych ulegają retencji jako pre-mRNA z zachowaną sekwencją intronową.

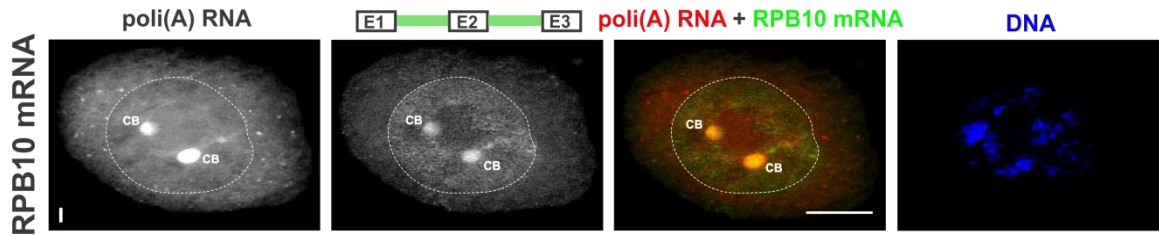
Pre-mRNA białka SmG zawierające pierwszy intron obserwowano praktycznie w całej objętości nukleoplazmy, a także w ciałach Cajala (Ryc. 25A). Natomiast transkrypty z drugim i trzecim intronem lokalizowane były tylko w okolicach otoczki jądrowej (Ryc. 25B, C).

Otrzymane wyniki mogą wskazywać, iż 2 i 3 intron usuwane są z pre-mRNA SmG już prawdopodobnie podczas kotranskrypcyjnego splicingu, a terytorium chromosomowe zawierające ten gen/y znajduje się na peryferiach jądra. Natomiast formą retencyjną mRNA kodującego białko SmG w mikrosporocytach zdaje się być mRNA nie w pełni dojrzałe z zachowanym/retencyjnym pierwszym intronem.

Podobną analizę przeprowadzono dla mRNA kodujących białka SmD1, SmD2 oraz RPB10 (Ryc. 25D-I). Podobnie jak w przypadku mRNA kodującego białko SmG ulegały one retencji w formie niedojrzałej. Pre-mRNA kodujące białko SmD2 ulegało retencji tylko z jednym, trzecim intronem (Ryc. 25D-F). Natomiast pre-mRNA kodujące białka SmD1 i RPB10 z

wszystkimi intronami, co możemy zaobserwować poprzez ich lokalizację w całej objętości nukleoplazmy i CB (Ryc. 25G-I).

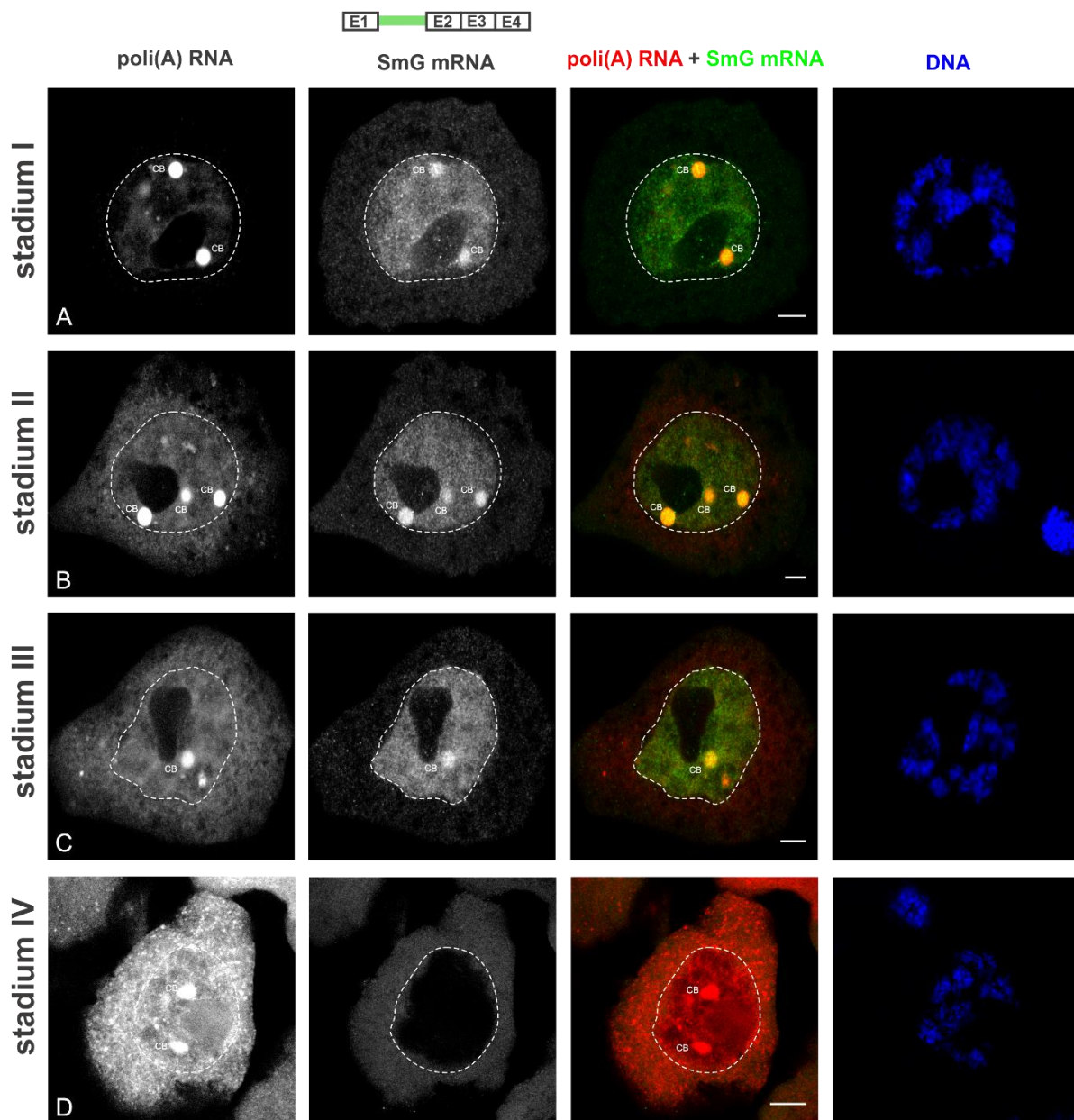




Ryc. 25 Przestrzenna lokalizacja mRNA zawierających introny białek SmG, D2, D1 i podjednostki RPB10. E1-E4- eksony, czarnymi i zielonymi prostokątami oznaczono introny, zielonym prostokątem oznaczono intron poddawany analizie. Szczegółowy opis w tekście. CB – ciało Cajala. Skala 10 μ m.

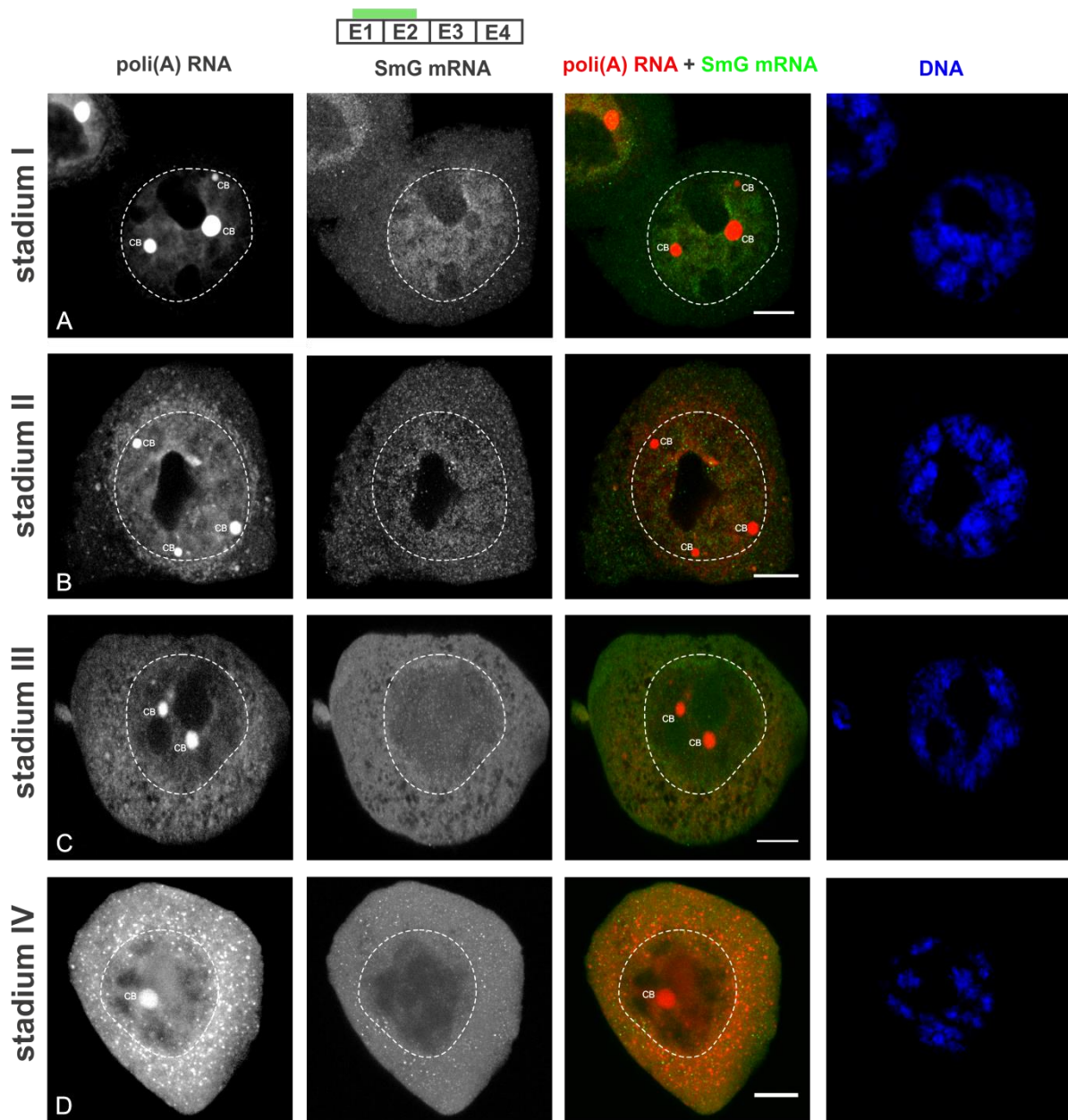
6.6. Pre-mRNA ulegają retencji, aż do trzeciego stadium cyklu

Ostatnim zadaniem badawczym było określenie jak długo trwa retencja niedojrzałych transkryptów, oraz kiedy pre-mRNA z zachowanym intronem/ami ulega potranskrypcyjnemu splicingowi. W tym celu szczegółowej analizie dystrybucji poddano pre-mRNA białka SmG z pierwszym intronem retencyjnym, a wyciętymi pozostałymi intronami (Ryc. 26), oraz formę mRNA po wycięciu intronu retencyjnego (Ryc. 27) podczas cyklu. Przeprowadzona analiza wykazała, iż forma niedojrzała mRNA białka SmG obecna jest na terenie jądra komórkowego aż do III stadium cyklu (Ryc. 26A-C). W tych stadiach pre-mRNA białka SmG widoczne było zarówno na terenie nukleoplazmy, jak i w ciałach Cajala (Ryc. 26A-C).



Ryc. 26 Przestrzenna i czasowa dystrybucja niedojrzałej formy mRNA białka SmG z zachowaną sekwencją pierwszego intronu w cyklu. Podczas I stadium obserwowano silne nagromadzenie pre-mRNA białka SmG w jądrze komórkowym (Ryc. 26A). Pre-mRNA widoczne było zarówno na terenie nukleoplazmy, jak i w ciałach Cajala. Podczas dwóch kolejnych stadiów (II-III) lokalizacja pre-mRNA białka SmG nie uległa zmianie (Ryc. 26B,C), widoczne było ono nadal na terenie nukleoplazmy, jak i CB. Brak akumulacji na terenie jądra komórkowego formy niedojrzałej mRNA białka SmG z zachowaną sekwencją intronu pierwszego zaobserwowano podczas ostatniego stadium (IV) cyklu (Ryc. 26D). E1-E4-eksony, zielonym prostokątem oznaczono intron poddawany analizie. Szczegółowy opis w tekście. CB – ciało Cajala. Skala 10 μ m.

Następnie sprawdzono, czy i kiedy zachowane introny są wycinane z pre-mRNA. Zaprojektowano sondę dla sekwencji na granicy pierwszego i drugiego eksonu mRNA białka SmG (po wycięciu pierwszego intronu) i sprawdzono lokalizację takich transkryptów podczas pojedynczego cyklu (Ryc. 27). Już w pierwszym stadium zaobserwowano w pełni dojrzały transkrypt (Ryc. 27A). W stadium tym transkrypt obecny był głównie w nukleoplazmie i co ciekawe, w przeciwieństwie do transkryptu z zachowanym intronem, nie zaobserwowano jego akumulacji w CB. Prawdopodobnie splicing retencyjnych intronów odbywa się natychmiast po uwolnieniu takich transkryptów z CB i przed ich eksportem do cytoplazmy. W kolejnych stadiach w pełni dojrzałe transkrypty były obecne zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie (Ryc. 27B-D). W drugim stadium zaobserwowano podobny poziom mRNA białka SmG zarówno w jądrze (Ryc. 27B), jak i cytoplazmie, podczas gdy w kolejnych stadiach poziom na terenie jądra komórkowego zmniejszył się. Zaobserwowano wzrost poziomu tych cząsteczek na terenie cytoplazmy (Ryc. 27C-D). Prawdopodobnie tempo eksportu i dalszego wykorzystania tych transkryptów różni się w zależności od etapu cyklu. W pierwszych dwóch stadiach znaczna kumulacja w pełni dojrzałych transkryptów w jądrze może wskazywać, że szybkość ich eksportu do cytoplazmy nie jest zbyt wysoka. Jednak w kolejnych stadiach poziom jądrowy znacznie obniża się i mRNA białek SmG jest więcej w cytoplazmie, co może oznaczać znaczny wzrost szybkości eksportu.

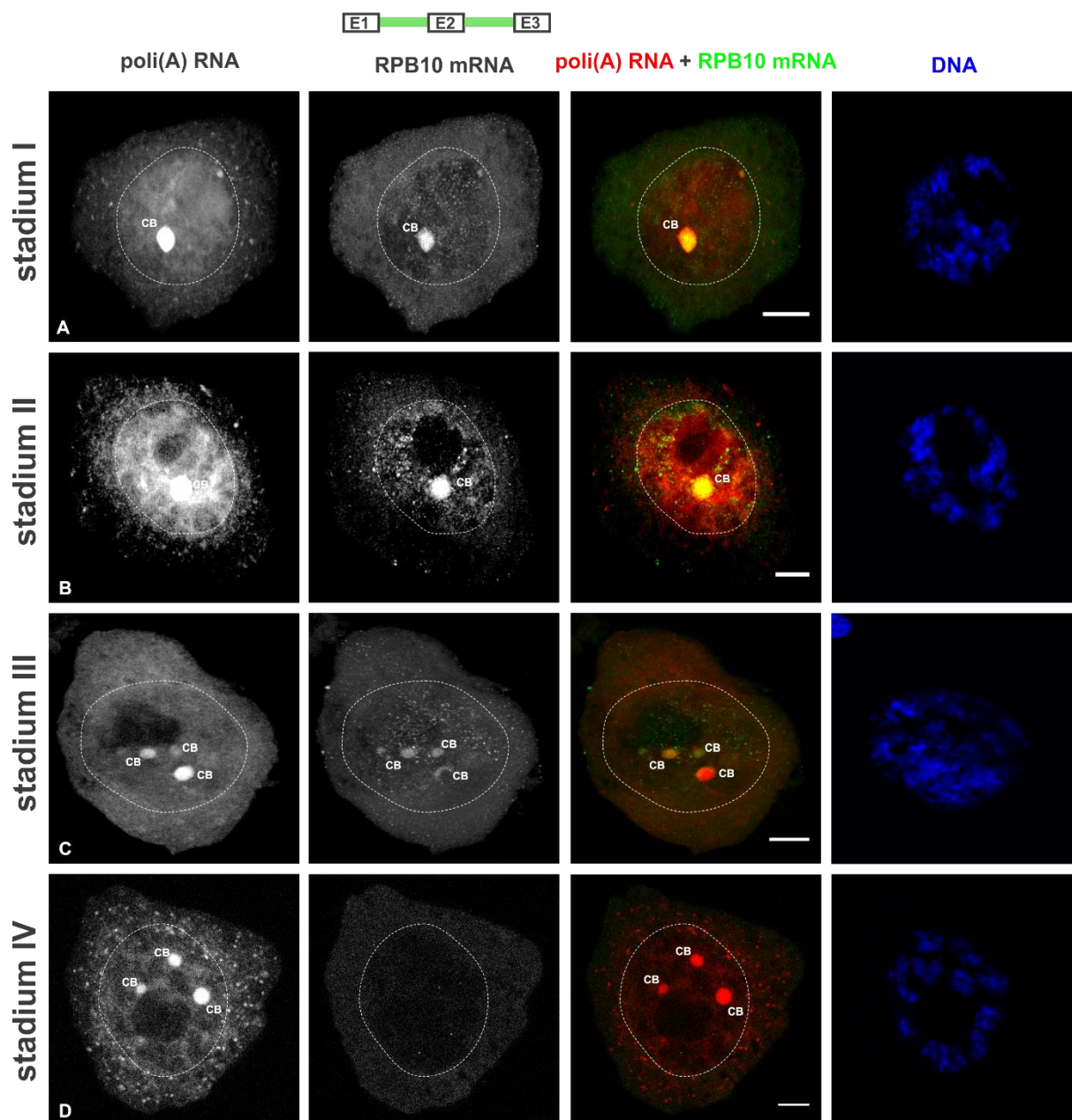


Ryc. 27 Przestrzenna i czasowa dystrybucja dojrzałej formy mRNA białka SmG w cyklu.

Podczas I stadium mRNA białka SmG obserwowane było głównie na terenie jądra komórkowego (Ryc. 27A). W stadium II oraz III mRNA białka SmG widoczne było na terenie cytoplazmy oraz jądra komórkowego na podobnym poziomie (Ryc. 27B,C). W ostatnim stadium (IV) mRNA nie było obserwowane na terenie jądra komórkowego (Ryc. 27D). mRNA widoczne było głównie na terenie cytoplazmy w postaci licznych drobnych skupień. E1-E4-eksony, zielonym prostokątem oznaczono koniec eksonu 1 i początek eksonu 2, do których zaprojektowano sondę, hubrydującą tylko do dojrzałych mRNA. Szczegółowy opis w tekście.

CB – ciało Cajala. Skala 10 μm .

Drugim badanym mRNA należącym do grupy transkryptów długoretencyjnych jest mRNA RPB10. Przestrzenna analiza lokalizacji pre-mRNA RPB10 z zachowaną sekwencją pierwszego i drugiego intronu, wykazała podobny wzorzec lokalizacji, jak pre-mRNA białka SmG. Zaobserwowano wyraźną akumulację transkryptów w jądrze komórkowym, zarówno w nukleoplazmie, jak i w ciałach Cajala, podczas pierwszych trzech etapów cyklu (Ryc. 28A-C). Niedojrzałe transkrypty nie były widoczne w ostatnim stadium (IV) (Ryc. 28D), podczas gdy całkowita pula mRNA kodującego podjednostkę 10 polimerazy II RNA widoczna była w tym stadium na terenie cytoplazmy (patrz Ryc. 18D).



Ryc. 28 Przestrzenna i czasowa dystrybucja niedojrzałej formy mRNA podjednostki 10 polimerazy II RNAz zachowaną sekwencją pierwszego i drugiego intronu w cyklu. I – IV - kolejne stadia cyklu poli(A) RNA w komórce. E1-E3- eksony, zielonymi prostokątami oznaczono introny poddawane analizie. Szczegółowy opis w tekście. CB – ciało Cajala. Skala 10 μ m.

7. DYSKUSJA

7.1. Retencja poli(A) RNA na terenie jądra komórkowego

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej opisują potranskrypcyjną regulację ekspresji genów, opartą na retencji mRNA w jądrze komórkowym. Wcześniejsze badania (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015) wykazały, że w mikrosporocytach modrzewia podczas diplotenu transkrypcja odbywa się w kilku pulsach, w których syntetyzowane są znaczne ilości poliadenylowanych transkryptów. Nie zaobserwowano jednak ich bezpośredniego eksportu na teren cytoplazmy, natomiast stwierdzono, że przez długi okres czasu obecne są głównie w nukleoplazmie i CB. Obserwacje te wskazują, że w mikrosporocytach dochodzi do czasowej retencji poli(A) RNA na terenie jądra.

Czasowe zatrzymanie mRNA na terenie jądra komórkowego zaobserwowano także, m.in. w ludzkich fibroblastach, w których zaobserwowano małą kolokalizację pomiędzy nowo zsyntetyzowanym transkrypcyjnym i poliadenylowanym RNA na terenie jądra komórkowego (Fay i wsp. 1997). Przeprowadzone badania mogą wskazywać, że poli(A) RNA pochodziło z poprzedniej rundy transkrypcyjnej i zostało zatrzymane na terenie jądra komórkowego.

Badania na komórkach muszki owocowej *Drosophila melanogaster* w różnych stadiach embriogenezy, podczas których lokalizowano zarówno mRNA jak i ich produkty białkowe, wykazały, że w większości przypadków ekspresja genów przebiega w typowy sposób tj. transkrypcja, eksport do cytoplazmy i biosynteza białka. Jednak w przypadku niektórych mRNA obserwowano ich retencję na terenie jądra komórkowego, a poziom syntezy ich produktów był niewielki lub nie obserwowano go wcale (Lecuyer i wsp. 2007).

Jądrową retencję mRNA wykazano także m.in. w komórkach wydzielniczych (Halpern i wsp. 2015), w komórkach generatywnych i różnicujących się (Averbeck i wsp. 2005, Boothby i wsp. 2013) czy też w komórkach poddanych warunkom stresowym (Prasanth i wsp. 2005, Niedojadło 2014). Jak dotąd nie odnotowano jednak takiego rodzaju koordynacji ekspresji genów w komórkach generatywnych u roślin nasiennych. Dlatego w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę scharakteryzowania regulacji ekspresji genów, poprzez retencję mRNA na terenie jądra komórkowego w mikrosporocytach modrzewia.

7.2. Cykl syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA

Przeprowadzona analiza pojedynczego cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA potwierdziła, że w mikrosporocytach modrzewia dochodzi do czasowej retencji poliadenylowanych transkryptów na terenie jądra komórkowego. W cyklu tym wyodrębniono cztery stadia, które charakteryzowały się zmiennym poziomem oraz dystrybucją poli(A) RNA. Badania wykazały, że po syntezie w I stadium transkrypty pozostawały na dużo wyższym poziomie w jądrze niż w cytoplazmie jeszcze w stadium drugim cyklu, co świadczyć może o ich retencji na terenie jądra. Dopiero w trzecim stadium obserwowano znaczny wzrost poziomu tych transkryptów na terenie cytoplazmy, który skorelowany był ze spadkiem ich puli jądrowej. Wskazuje to na eksport wcześniej zatrzymanych w jądrze transkryptów.

Pojedynczy cykl syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA w mikrosporocytach został poddany dalszym badaniom. Przeprowadzono analizę transkryptomów zarówno całkowitego jak i cytoplazmatycznego. Identyfikacja transkryptów obecnych w cytoplazmie miała na celu wyłonienie potencjalnych mRNA, które będą ulegały translacji. Wybrane transkrypty przeanalizowano pod kątem zmian dystrybucji w mikrosporocytach podczas kolejnych stadiów cyklu. Ponieważ badania zostały przeprowadzone podczas tego samego cyklu, możliwe było porównanie długości okresu ich gromadzenia w jądrze oraz selektywnego eksportu poszczególnych grup transkryptów. Retencja na terenie jądra komórkowego wpływała na moment pojawienia się mRNA w cytoplazmie. Powyższe badania wykazały, że transkrypty te różnią się czasem retencji na terenie jądra, a także tempem i czasem ich eksportu na teren cytoplazmy.

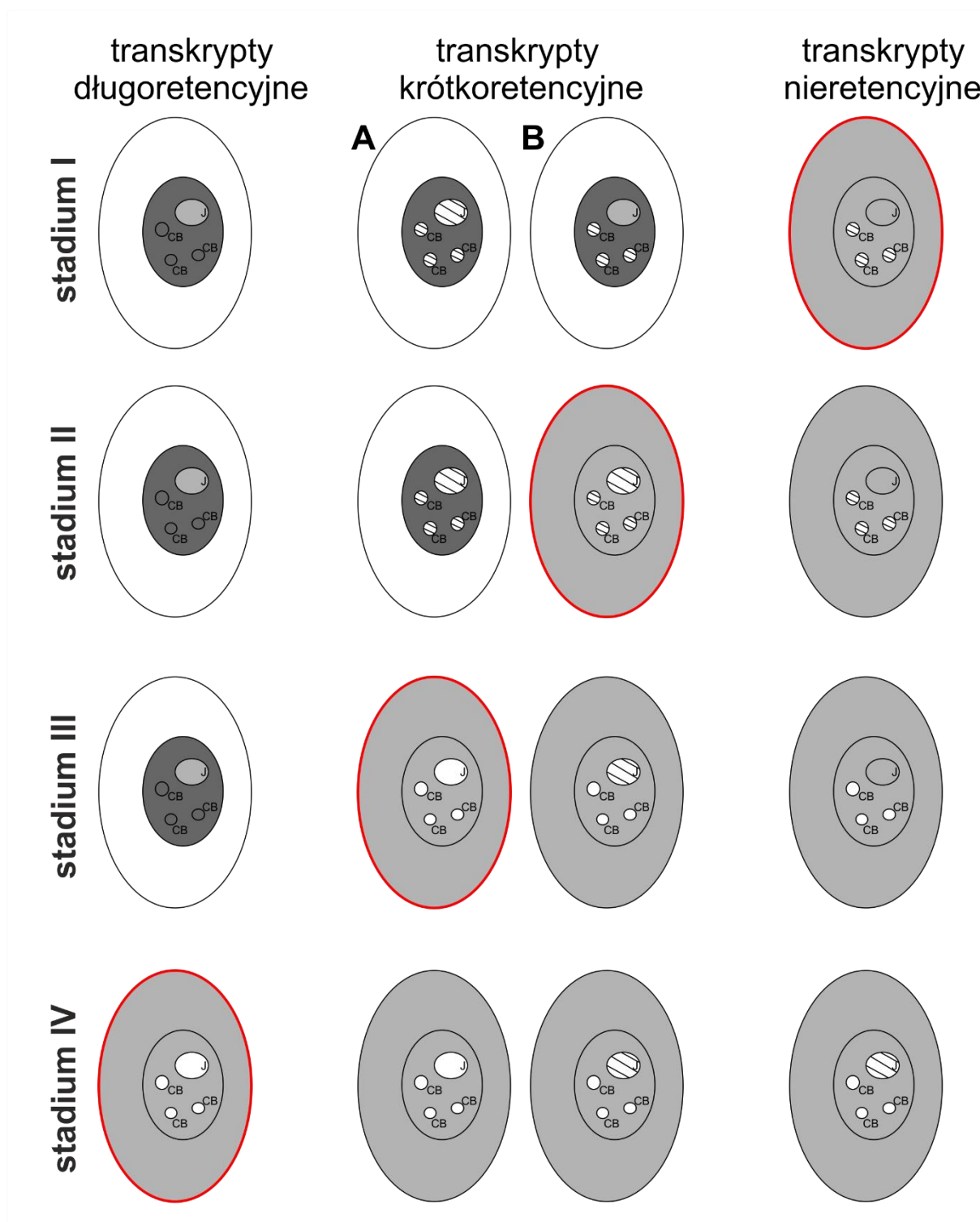
Biorąc pod uwagę kryterium czasu retencji na terenie jądra oraz stadium cyklu w której mRNA pojawia się na terenie cytoplazmy wyróżniono trzy grupy transkryptów:

(1) transkrypty, których poziom jądrowy jest wysoki przez większość cyklu, a pojawianie się transkryptów w cytoplazmie następuje pod koniec cyklu (długoretencyjne) (Ryc. 29). Transkrypty te związane były głównie z transkrypcją i procesami modyfikacji potranskrypcyjnej,

(2) transkrypty, których retencję na terenie jądra obserwowano do I/II stadium, a w II/III stadium poziom transkryptów znacząco wzrastał w cytoplazmie (krótkoretencyjne) (Ryc. 29). mRNA należące do tej grupy kodowały białka związane z (i) cytoszkieletem i syntezą ściany komórkowej; (ii) rybosomami, translacją oraz modyfikacją potranslacyjną białek; (iii) mRNA

związane z mitochondriami i przemianami energetycznymi; oraz z (iv) transkrypcją i procesami modyfikacji potranskrypcyjnej,

(3) transkrypty, których poziom jądrowy i cytoplazmatyczny od początku cyklu był porównywalny (nieretencyjne) (Ryc. 29). mRNA kodowały białka związane z (i) fotosyntezą i plastydami; (ii) cytoszkieletem i ścianą komórkową; (iii) mitochondriami i przemianami energetycznymi; oraz (iv) rybosomami, translacją i modyfikacjami potranslacyjnymi białek.



Ryc. 29 Schemat pokazujący czas retencji oraz zaangażowania domen jądrowych w ten proces. A-transkrypty krótkoretencyjne, ulegające retencji w I stadium, B- transkrypty krótkoretencyjne, ulegające retencji w I i II stadium. Kolorem szarym oraz jego odcieniem oznaczono miejsce i poziom gromadzenia (wyższy poziom oznaczono ciemniejszym kolorem) mRNA, kolorem białym oznaczono brak gromadzenia mRNA, obszarem kreskowanym

oznaczono brak gromadzenia się wszystkich mRNA w danej grupie w domenie jądrowej, czerwonym obrysem komórki oznaczono stadium, w którym obserwujemy znaczący wzrost poziomu mRNA w cytoplazmie. I-IV- kolejne stadia cyklu, CB-ciało Cajala, J-jąderko

7.3. Jądrowa retencja mRNA reguluje tempo eksportu i czas translacji

Jak wynika z badań transkryptomu oraz dystrybucji poszczególnych grup transkryptów w mikrosporocytach modrzewia w jednym pulsie transkrypcyjnym są syntetyzowane mRNA, które w różnym tempie ulegają eksportowi do cytoplazmy, co związane jest z translacją różnych grup białek w innym czasie cyklu. Różnice te spowodowane są głównie długością retencji na terenie jądra komórkowego. Dzięki takiej strategii mikrosporocyty modrzewia, pomimo krótkotrwałego pulsu transkrypcji mogą modulować różnorodnością proteomu w znacznie dłuższym okresie czasu. Podobną strategię obserwowano w komórkach wydzielniczych ssaków. W komórkach tych podobnie jak w mikrosporocytach proces transkrypcji przebiega w pulsach, przedzielonych czasowym spadkiem aktywności transkrypcyjnej. Pulsacyjna transkrypcja prowadziła do gwałtownej zmiany ilości oraz różnorodności mRNA w komórce, które nazywane było „hałasem ekspresji genów”. Kiedy komórki były aktywne transkrypcyjnie, na terenie jądra komórkowego gromadziło się mRNA, natomiast kiedy były nieaktywne jądrowa pula mRNA malała (Halpern i wsp. 2015). Podczas spermatogenezy mikrospory paproci *Marsilea vestita* są wyciszone transkrypcyjnie, pomimo tego na terenie komórki pojawiają się nowo zsyntetyzowane białka. Transkrypty, które je kodują pochodzą z poprzedniej rundy transkrypcyjnej. W komórkach tych dochodzi do regulacji translacji białka, poprzez retencję mRNA na terenie jądra komórkowego (Boothby i wsp. 2013). Czasowe zatrzymanie mRNA w jądrze komórkowym, w pewien sposób koordynuje fluktuacje wywołane przez nadmiar mRNA na terenie komórki. Czasowa retencja w jądrze wpływa na poziom oraz miejsce akumulacji mRNA w komórkach związane ze zmianami aktywności transkrypcyjnej komórki.

Badania wskazują, że w komórkach generatywnych o pulsacyjnej transkrypcji selektywny transport mRNA do cytoplazmy odgrywa kluczową rolę. Gwałtowny wzrost poziomu transkryptów, który występuje w tych komórkach, musi skutkować istnieniem mechanizmu, który zapobiega gwałtownemu i jednoczesnemu ich eksportowi do cytoplazmy. Retencja na terenie jądra komórkowego oraz późniejszy selektywny eksport mRNA do cytoplazmy

(Brandt i wsp. 2006, Grosskortenhouse i wsp. 2006), może być kluczową strategią, mającą znaczenie w rozwoju tych komórek. Transkrypty syntetyzowane podczas wzrostu aktywności transkrypcyjnej, są czasowo zatrzymywane na terenie jądra komórkowego, aby w okresach obniżenia jej aktywności uległy eksportowi do cytoplazmy.

7.4. mRNA ulegają retencji w jądrze w różnym stopniu dojrzałości

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej wskazują, iż w mikrosporocytach jądrowa retencja mRNA dotyczy pre-mRNA z zachowanym intronem/intronami. Wiele badań sugeruje, iż pre-mRNA, które nie przeszło procesu dojrzewania ulega degradacji. Retencja jądrowa pre-mRNA została dobrze opisana u drożdży. Tylko 5% genów u drożdży zawiera introny (zwykle tylko jeden), które zazwyczaj nie ulegają alternatywnemu splicingowi. Hamowanie splicingu u drożdży powoduje nagromadzenie pre-mRNA w ich miejscach transkrypcji. Z powodu nieefektywności poliadenylacji i zatrzymania aktywności polimerazy II RNA, pre-mRNA pozostaje zasocjowane z chromatyną i ostatecznie degradowane przez jądrowy egzozom (Tutucci i Stutz 2011).

Najnowsze badania wskazują jednak, że na terenie jądra komórkowego może występować także mechanizm, w którym pomimo niedojrzałości poli(A) RNA jest ono uwalniane z miejsca transkrypcji i nie jest od razu degradowane przez egzozom (Yoshimoto i wsp. 2017). Badania przeprowadzone na komórkach ssaczych, w których zatrzymano splicing za pomocą spliceostatyny A, działającej jako selektywny inhibitor splicingu, poprzez zablokowanie asocjacji spliceosomu, wykazały akumulację niedojrzałych poliadenylowanych transkryptów na terenie jądra komórkowego. Wydaje się, że nie jest to przykład alternatywnego splicingu (AS), podczas którego z jednego genu powstaje więcej niż jedna izoforma mRNA. Rodzaj powstającej izoformy mRNA w AS jest wynikiem działania mechanizmów regulacyjnych, które pozwalają na uzyskanie na przykład tkankowo-specyficznego wzoru splicingu bądź zmian komórkowego profilu splicingu na różnych etapach rozwoju. Jest to możliwe dzięki współdziałaniu szeregu elementów, spośród których należy wymienić: sekwencję nukleotydową oraz strukturę drugorzędową pre-mRNA, czynniki splicingowe oraz dodatkowe czynniki białkowe i niebiałkowe.

Transkrypty z zachowaną sekwencją intronową, które ulegają retencji, nie są eksportowane do cytoplazmy i pozostają na terenie jądra komórkowego. Introny w niedojrzałym mRNA

stanowią jedną z grup retencyjnych intronów (IR), zwanych „zatrzymanymi” intronami (DI) (Wegener i Müller-McNicoll 2018). Transkrypty zawierające DI są niewrażliwe na NMD, ale podobnie jak IR, DI negatywnie wpływają na ekspresję białka poprzez zapobieganie translacji odpowiednich mRNA. Jednak, w przypadku DI inhibicja ta jest przemijająca i odwracalna, ponieważ mRNA nie ulegają degradacji. Różne bodźce, które działają na komórkę np. hamowanie aktywności kinazy, uszkodzenia DNA lub aktywacja neuronów, może powodować szybkie, potranskrypcyjne wycinanie DI w celu koordynacji eksportu jądrowego (Boutz i wsp. 2015). Badania wskazują iż DI są krótsze i posiadają słabsze miejsca splicingowe 5' i 3' w porównaniu z intronami, które ulegają ko-transkrypcyjnemu wycinaniu (Yap i wsp. 2012).

Potranskrypcyjny splicing „zatrzymanych” intronów został zaobserwowany w ludzkich, bezjądrowych płytkach krwi, które powstają poprzez oderwanie cytoplazmy megakariocytów. W cytoplazmie tych komórek znajdują się czynniki splicingowe zdolne do utworzenia funkcjonalnego spliceosomu jak również pre-mRNA interleukiny-1 β zawierające nie wycięte introny. Zarówno pre-mRNA jak i czynniki spliceosomalne zostały przetransportowane do płytek krwi z megakariocytów. W efekcie zewnętrznego bodźca inicjowany jest splicing pre-mRNA, który następnie ulega translacji na terenie cytoplazmy płytek krwi (Denis i wsp. 2005). Mechanizm regulacji ekspresji dwóch cyklin, *crs1* i *rem1*, poprzez potranskrypcyjne wycinanie intronów opisano także w mejotycznie dzielących się komórkach drożdży (Averbeck i wsp. 2005), oraz zarodkach kurzych podczas gastrulacji (Mensilla i wsp. 2005). Zachowanie intronu w mRNA zostało zaobserwowane także w komórkach generatywnych u roślin. W komórkach, które są wyciszone transkrypcyjnie, podczas spermatogenezy u paproci *Marsilea vestita*, różnicujące się spermatydy nie wznawiają aktywności transkrypcyjnej, a więc wykorzystują zsyntetyzowane wcześniej mRNA (Boothby i wsp. 2013). Analiza retencyjnych mRNA wykazała, że akumulowane są mRNA z zachowaną sekwencją intronową. Aby sprawdzić czy mRNA z DI przechodzą proces dojrzewania, autorzy przeprowadzili analizę w której wyizolowali RNA w różnych okresach rozwoju. Analiza wykazała, że mRNA z DI było obecne od początkowych stadiów rozwoju, natomiast dojrzały transkrypt, dopiero w 4 godzinie rozwoju. Analiza ilościowa wykazała, że ilość mRNA z DI malała wraz z rozwojem komórki, w przeciwieństwie do dojrzałej formy transkryptu. Ponieważ mRNA z DI, było nadal wykrywalne, po pojawieniu się dojrzałego mRNA, autorzy chcieli wykazać, że pojawienie się dojrzałego transkryptu w pełni zależy od splicingu. W tym celu wykorzystali inhibitor splicingu spliceostatynę A (SSA). Ponowna analiza qPCR wykazała, iż w mikrosporach, nawet po 8 godzinie rozwoju po zastosowaniu SSA nie

obserwowano dojrzałej formy mRNA, podczas gdy transkrypt z DI był obecny. Zaobserwowano, że zastosowanie SSA powodowało wstrzymanie rozwoju komórek, tuż przed końcowym podziałem. Otrzymane wyniki wskazują, że splicing transkryptów z DI jest niezbędny podczas prawidłowego rozwoju komórek. mRNA z DI są przechowywane w mikrosporach od początku rozwoju gametofitu, następnie podczas określonego etapu rozwoju intron ulega potranskrypcyjnemu splicingowi i powstaje dojrzała forma mRNA, która może ulegać translacji. Kolejnym etapem badań była analiza funkcjonalna mRNA z DI. Wyniki wskazują, że mRNA z zachowaną sekwencją intronową nie są związane z żadną unikatową funkcją, procesem ani lokalizacją w komórce. Wykazano, że białka kodowane przez te mRNA zaangażowane są w rozwój komponentów komórkowych, czy procesów podczas późnych etapów rozwoju komórki, takich jak centrosomy, wici, rzęski, różnicowanie gamet, czy śmierć komórki.

Badania transkryptomocne u paproci *Marsilea vestita* wykazały, że retencji zazwyczaj ulegał tylko jeden, bardzo krótki (ok. 100 pz) intron, choć geny tych transkryptów posiadały ich więcej. Wskazuje to, że nowo syntetyzowane transkrypty przechodzą częściowe dojrzewanie i retencji ulega tylko jeden ściśle określony intron, podczas gdy pozostałe ulegają splicingowi (Boothby i wsp. 2013).

Mechanizm w którym tylko niektóre introny pozostają w retencyjnym pre-mRNA został także zaobserwowany w mikrosporocytach modrzewia. Analiza trzech transkryptów kodujących białka SmD2, SmDG i SmD1, których geny posiadają trzy (SmD2, SmG) lub dwa (SmD1) introny wykazała, iż retencji ulegały tylko niektóre z nich. W przypadku SmD2, był to ostatni intron, SmG pierwszy intron, natomiast przy SmD1 oba introny. Wyniki wskazują, iż pierwszy intron, który ulega retencji w transkrypcie SmG, w dalszych etapach rozwoju mikrosporocytów, jest usuwany i dojrzały już transkrypt jest eksportowany do cytoplazmy. Podobnie do transkryptów kodujących białka Sm G, transkrypt podjednostki 10 polimerazy II RNA, w którym retencji ulegają wszystkie introny, w późnych etapach cyklu prawdopodobnie podlega splicingowi oraz transportowi do cytoplazmy. W literaturze spotkać można doniesienia wskazujące, że poliadenylowane mRNA z DI, które zatrzymywane są na terenie jądra komórkowego zawierało podobnie jak w mikrosporocytach tylko jeden lub dwa introny, które nie ulegały ko-transkrypcyjnemu splicingowi (Jacob i Smith 2017). Badania potwierdzają także, iż właśnie zewnętrzne introny zostają zachowane w mRNA z DI, podczas gdy wewnętrzne są wycinane ko-transkrypcyjnie (Brugiolo i wsp. 2013). Powyższe dane wraz z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy wskazują, że regulacja ekspresji genów związana

z zatrzymaniem intronów w mRNA, oraz potranskrypcyjnym ich splicingiem jest procesem konserwowanym u *Eukaryota*, powszechnym w królestwie zwierząt, jak i roślin.

Niewiele jest także informacji dotyczących mechanizmu prowadzącego do rozpoznania pre-mRNA z DI. Nieliczne wcześniejsze badania sugerują, że prawdopodobnie wczesne rozpoznanie intronu stanowi kluczowy element wpływający na retencję niedojrzałego mRNA w jądrze komórkowym (Chang i Sharp 1989). Badania przeprowadzone na komórkach HeLa wykazały, że U1 snRNP i U2AF, ale nie U2 snRNP, są niezbędne dla jądrowej retencji pre-mRNA. Wydaje się, że utworzenie wczesnego kompleksu splicingowego (E) jest odpowiedzialne za retencję pre-mRNA (Takemura i wsp. 2011). Jednak badania Casolari i Silver (2004) wykazały, że retencja pre-mRNA na terenie jądra komórkowego nie jest zależna tylko od kinetyki splicingu. Może obejmować także fizyczne interakcje pre-mRNA z jądrowymi elementami strukturalnymi NPC obejmującymi białka Mlp1, które są niezbędne dla eksportu mRNA. Delecja Mlp1 prowadzi do zwiększenia ilości pre-mRNA zawierających intron oraz ich „wyciek” do cytoplazmy (Casolari i Silver 2004).

Poprzez analizę transkryptomiczną poli(A) RNA w mysich embrionalnych komórkach macierzystych (mESCs), wykazano bardzo duży procent jądrowych transkryptów zawierających introny. Wiele z tych intronów było również obecnych i często konserwowanych w zróżnicowanych, komórkach wątroby dorosłych myszy, jak również w ludzkich liniach komórkowych. Szczegółowe badania wykazały, iż na zatrzymanie mRNA z DI może mieć wpływ aktywność kinazy Clk. Kinaza Clk fosforyluje rodzinę białek SR na terenie jądra komórkowego, które są niezbędne podczas procesu splicingu. Mechanizm retencji oraz wycinania retencyjnych intronów, związany jest z inhibitorem Clk, który promuje potranskrypcyjny splicing lub retencję intronów w wielu transkryptach poprzez zmianę fosforylacji białek SR. Autorzy wysunęli hipotezę, która wskazuje iż regulacja dojrzewania transkryptów z DI związana jest z odpowiedzią na zmiany zachodzące na terenie komórki (Boutz i wsp. 2015).

Kolejny mechanizm regulujący poziom białka wykazano podczas badania jądrowego białka wiążące poli(A) 1 (PABPN1), które koordynuje poziom swojego białka poprzez zablokowanie eksportu mRNA, które je koduje (Bergeron i wsp. 2015). Gdy PABPN1 obecny jest na wysokim poziomie, wiąże się z regionem bogatym w adeniny w obrębie 3' UTR własnego mRNA, co zapobiega wiązaniu się z czynnikiem splicingowym (SRSF10), skutkując zatrzymaniem ostatniego intronu w transkrypcie. Natomiast przy niskim poziomie PABPN1, ostatni intron jest usuwany z transkryptu potranskrypcyjnie i dojrzałe mRNA są uwalniane do cytoplazmy i ulegają translacji.

Zjawisko retencji intronów w mRNA wyjaśnia także mechanizm w którym czynniki retencji jądrowej przyłączają się do pre-mRNA, blokując możliwość przyłączenia czynników eksportowych. Przypuszcza się również, że czynniki te zakotwiczą pre-mRNA w pewnych strukturach jądrowych (Takemura i wsp. 2011). Wydaje się, że struktury te najprawdopodobniej spełniają dodatkowe, nie do końca wyjaśnione jeszcze funkcje, szczególnie w komórkach roślinnych.

Dane literaturowe wskazują że DI ulegają splicingowi w różnym czasie. Oznacza to na istnienie mechanizmu regulacji pozwalającego na selektywny splicing tylko niektórych transkryptów. Istnieją dwa prawdopodobne scenariusze, które mogą wyjaśnić kontrolę usunięcia intronu. Pierwszy z nich zakłada że introny zawierają sekwencje lub pewne struktury, które oddziałują z czasowymi regulatorami splicingu (Wang i Burge 2008). Czasowy regulator ulega translacji, jest aktywowany lub inhibowany przez określony czas, a następnie jest zdolny do interakcji i promowania splicingu DI zawierających prawidłową sekwencję i/lub strukturę. Poprzez posiadanie wielu czasowych regulatorów, komórka może skutecznie regulować splicing różnych transkryptów z DI w różnym czasie (Boothby i wsp. 2013). Drugi scenariusz zakłada, iż komórka jest w pełni zdolna do splicingu wszystkich DI, jednakże substraty do splicingu są ukryte (Deeb i wsp. 2010, Boothby i Wolniak 2011), lub w inny sposób zablokowane. Odblokowanie transkryptów z DI, powodowałaby asocjację maszynarii splicingowej ich splicing (Boothby i wsp. 2013).

Badania przeprowadzone w nieniejszej pracy doktorskiej wskazują, iż w mikrosporocytach jądrowe opóźnienie eksportu mRNA nie musi dotyczyć tylko niedojrzałej formy mRNA. mRNA (mRNA SmG z usuniętymi wszystkimi intronami), w pierwszym stadium cyklu ulegało zatrzymaniu na terenie jądra komórkowego, dopiero w II stadium uległo transportowi na teren cytoplazmy. Może wskazywać to, iż w mikrosporocytach *Larix* dochodzi do opóźnienia eksportu dojrzałego mRNA do cytoplazmy.

Jednymi z pierwszych badań które wskazują, iż dojrzała mRNA gromadzone jest na terenie jądra komórkowego, są badania przeprowadzone na izolowanych jądrach erytroblastów kurczaka (Ross i wsp. 1982) oraz kurzego jajnika (Ciejek i wsp. 1982). Ilość dojrzałej formy mRNA β -globiny znacząco przewyższała ilość jego pre-mRNA na terenie jądra komórkowego. Lokalizacja mRNA z użyciem mikroskopu elektronowego wyklucza możliwość jego cytoplazmatycznego pochodzenia. Badania przeprowadzone na mysich fibroblastach także wykazały, że ilość dojrzałej formy mRNA genów *c-myc*, *c-jun*, *CHO-A* i *cyklofiliny*, znacząco przewyższała transkrypty, które tylko częściowo przeszły proces

splicing. Zaobserwowano, że stosunek akumulacji cytoplazmatycznej do jądrowej mRNA ("podział nukleo-cytoplazmatyczny") znacznie się różnił w zależności od genów i typów komórek. Wyniki te wskazują, że w przypadku niektórych mRNA transport jest znacznie wolniejszy i/lub nieskuteczny niż przewidywano (Gondran i wsp. 1999).

Obecność dojrzałego mRNA odnotowano także w komórkach tkanek wydzielniczych ssaków (wątroba, trzustka, jelito). Wśród tych transkryptów są m.in. mRNA kodujące czynnik transkrypcyjny ChREBP (wątroba, trzustka, jelito cienkie), glukokinazę, receptor glukagonu (trzustka) czy Nlrf6 (jelito) (Helpm i wsp. 2015). Znakowanie pojedynczej cząsteczki *in situ* zastosowane do pomiaru czasu przebywania mRNA na terenie jądra komórkowego ujawniło, że transkrypty tych genów mogą spędzić wiele godzin w jądrze, zanim zostaną wyeksportowane do cytoplazmy. Według autorów jądrowa retencja tych mRNA może w sposób efektywny buforować poziom i różnorodność cytoplazmatycznego mRNA powstałego z pojedynczego pulsu transkrypcyjnego oraz regulować eksport mRNA, a tym samym regulować tempo i wzorzec translacji.

Przedstawione powyżej badania, wskazują że dojrzałe transkrypty akumulowane na terenie jądra komórkowego nie są ukierunkowane na szybką degradację jądrową, ale raczej mają bardzo powolną kinetykę eksportu. Badania wskazują, że mRNA, które ulega retencji na terenie jądra może związane być z czynnikami retencji jądrowej, które zapobiegają jego eksportowi do cytoplazmy, rekrutacja czynników eksportowych do mRNA może być zablokowana, lub czynniki eksportowe dołączane są preferencyjnie do mRNA (Wegener i McNicoll 2017, Casolari i Silver 2004, Reed 2003). Czynniki eksportowymi dołączanymi preferencyjnie do mRNA mogą być np. białka hnRNP, które, odpowiedzialne są między innymi za eksport mRNA do cytoplazmy. HnRNP C posiada sygnał retencji jądrowej (NRS) i jego asocjacja lub dysocjacja prowadzi do regulacji eksportu mRNA (Izaurralde i Adam 1998).

Badania wykonane na komórkach wątroby myszy wykazały, iż w komórkach tych występuje mechanizm jądrowej retencji dojrzałych mRNA, który polega na retencji poprzez "zamknięcie" sekwencji kodującej białko mCAT2 (mysi kationowy transporter aminokwasów 2) w długim niekodującym RNA- CTN-RNA (Prasanth i wsp. 2005). Białko mCAT2 jest powierzchniowym receptorem zaangażowanym w wiązanie komórkowej L-argininy, która jest prekursorem syntezy tlenku azotu (NO). Szlak NO jest indukowany w komórkach poddawanych różnego rodzaju stresowi, w tym np. po infekcji wirusowej, czy gojeniu ran, jako część komórkowego mechanizmu obronnego. CTN-RNA jest transkrybowany z tego samego genu co jego kodujący białko partner (mCAT2), jednak transkrypcja odbywa się z

alternatywnego promotora, również miejsce poliadenylacji jest inne. Skutkuje to występowaniem unikalnych regionów nieulegających translacji – 5' UTR i 3' UTR. Wykazano, że we fragmencie 3' UTR CTN-RNA dochodzi do edycji adenozyiny do inozyny w wyniku czego w tym fragmencie powstają charakterystyczne struktury „spinki do włosów” na fragmencie około 100 pz. Sugeruje się, że to właśnie ten mechanizm odpowiada za retencję tego RNA na terenie jądra. W warunkach stresowych CTN-RNA poddawane jest potranskrypcyjnemu cięciu w regionie 3' UTR co skutkuje „uwolnieniem” mRNA podobnym do mRNA mCAT2, które następnie jest eksportowane do cytoplazmy gdzie ulega translacji do białka mCAT2.

7.5. Domeny jądrowe zaangażowane w retencję mRNA

Przeprowadzona przestrzenna i czasowa analiza dystrybucji mRNA w cyklu, wykazała, iż w mikrosporocytach w proces retencji zaangażowane są różne domeny jądrowe (Ryc. 29). Obserwowano lokalizację na terenie domen jądrowych takich jak ciała Cajala, czy jąderko. Wykazano także, iż w obrębie danej grupy transkryptów, mRNA wykazywało odmienny wzorec lokalizacji w obrębie domen jądrowych (Ryc. 29, obszar kreskowany).

Jak dotąd regulacja ekspresji genów polegająca na retencji mRNA w jądrze komórkowym nie była wiązana z żadną ze znanych domen jądrowych. Domeną jądrową o znaczącym udziale w retencji mRNA w niniejszej rozprawie doktorskiej są ciała Cajala. CBSą strukturami konserwowanymi ewolucyjnie, występującymi zarówno w komórkach zwierzęcych (Morris 2008) jak i roślinnych (Shaw i Brown 2004). Wskazuje to na ich fundamentalną rolę w metabolizmie jądra komórek eukariotycznych. W CB zachodzi wiele procesów związanych z modyfikacjami różnych typów RNA m.in. z dojrzewaniem i montażem snRNP (Frey i Matera 2001, Kiss 2004), rekrutacją i montażem systemu dojrzewania rybosomalnego RNA (Lamond i wsp. 2003), dojrzewaniem tRNA (Jarrous 2001) i mRNA histonów (Wagner i wsp. 2006), syntezą telomerów (Venteicher i wsp. 2009) czy systemem miRNA i siRNA (Pontes i Pikaard 2008). Wydaje się jednak, że dojrzewanie snRNP i montaż podjednostek spliceosomalnych są procesami kluczowymi dla CB (Smoliński i wsp. 2011). Akumulacja na ich terenie mRNA wydaje się być nową, wcześniej nie opisywaną funkcją tych domen jądrowych w komórkach eukariotycznych.

Jak wykazały badania w niniejszej pracy doktorskiej w mikrosporocytach modrzewia na terenie ciał Cajala akumulowane są tylko niedojrzałe mRNA długoretencyjnych transkryptów (z zachowaną sekwencją intronową), podczas gdy dojrzałe mRNA nie jest obserwowane. Niedojrzałe transkrypty długoretencyjne (pre-mRNA SmG i RPB10), lokalizowane są na wysokim poziomie w CB, aż do III stadium. Eksport z CB związany jest z eksportem mRNA do cytoplazmy. Po uwolnieniu do jądra komórkowego z CB, pre-mRNA podlega szybkiemu potranskrypcyjnemu dojrzewaniu, eksportowi do cytoplazmy oraz translacji. Retencja niedojrzałych transkryptów na terenie ciał Cajala u modrzewia stanowi potranskrypcyjną regulację ekspresji genów, poprzez opóźnienie ich translacji. We wcześniejszych badaniach wykazano, iż w mikrosporocytach modrzewia na terenie CB akumulują się mRNA kodujące białka, jednak nie rozpatrywano, w jakiej formie dojrzałości są one gromadzone. Wśród nich znajdowały się transkrypty genów metabolizmu podstawowego tj. mRNA kodujące: pektynmetyltransferazę, ATPazę, katalazę, peroksydazę czy α -tubulinę. Oprócz tych transkryptów zlokalizowano również transkrypty kodujące białka występujące powszechnie w ciałach Cajala tj. SmD1, SmD2, SmE jak również mRNA kodujące podjednostki polimerazy II RNA – RPB2 i RPB10 (Smoliński i Kołowerzo 2012). Wydaje się, że mechanizm retencji mRNA na terenie ciał Cajala może nie występować jedynie do komórkach generatywnych czy różnicujących się. Ostatnie badania wykazały, że zjawisko akumulacji poli(A) RNA w ciałach Cajala obecne jest także w komórkach somatycznych takich gatunków roślin jak *Allium cepa*, *Lupinus luteus* czy *Arabidopsis thaliana* (Niedojadło i wsp. 2014). Ponadto stwierdzono, iż u *A. thaliana* w komórkach merystematycznych korzenia CB odgrywają kluczową rolę w retencji poli(A) RNA, szczególnie w warunkach stresowych. W mutantach pozbawionych koiliny (co skutkuje również brakiem CB w komórkach), obserwowano upośledzenie metabolizmu komórkowego, prowadzącego do obniżonej żywotności roślin w warunkach stresu hipoksji (Niedojadło i wsp. 2016). Jednak w mikrosporocytach modrzewia wydaje się, że gromadzenie mRNA na terenie jądra komórkowego nie jest związane ze stresem, ale raczej jest niezbędne, aby transkrypty w odpowiednim czasie zostały wyeksportowane do cytoplazmy. Jak dotąd nie zaobserwowano akumulacji pre-mRNA na terenie ciał Cajala u innych gatunków. Wyniki te wskazują, że retencja pre-mRNA na terenie CB jest niezbędna przed ich potranskrypcyjnym dojrzewaniem i eksportem do cytoplazmy.

Drugą domeną jądrową, w której zaobserwowano w niniejszej pracy doktorskiej obecność mRNA jest jąderko. Domena ta odgrywa kluczową rolę podczas dojrzewania, składania, czy eksportu cząsteczek rybonukleoproteinowych (RNP), takich jak cząsteczki rozpoznające

sygnał i telomerazowe RNP, niektóre tRNA i U6 snRNA. Uczestniczy także w kontroli cyklu komórkowego, rozwoju komórek, procesie starzenia się, czy stresie komórkowym (Kim i wsp. 2009). Nową rolę przypisywaną tej domenie jądrowej jest gromadzenie mRNA. Niektóre z tych obserwacji zostały wykonane podczas poddawania komórek różnego rodzaju stresowi. Usunięcie jednego z komponentów egzozomu, poprzez wywołanie szoku cieplnego, powodowało znaczną akumulację poli(A) RNA na terenie jąderka (Carneiro i wsp. 2007). Nieliczne doniesienia wskazywały także, iż w komórkach nie poddawanych stresowi mRNA akumulowało się na terenie jąderka (Kim i wsp. 2009). Możliwość, że niektóre mRNA mogą przemieszczać się przez jąderko przed eksportem do cytoplazmy, została po raz pierwszy opisana podczas badania jąder komórkowych ptasich erytrocytów, poprzez ich fuzję z komórkami HeLa (Sidebottom i Harris 1969). W powstałych heterokarionach tylko wtedy, gdy jąderko tworzyło się w aktywowanym jądrze erytrocytów, mRNA mogło być transkrybowane z genomu kurczęcia, transportowane do cytoplazmy, a następnie ulegało translacji (Reyes-Gutierrez i wsp. 2014). Prawdopodobnie jąderko odgrywa rolę rusztowania dla interakcji zachodzących pomiędzy mRNA, a miRNA, być może przed translacją w cytoplazmie. Autorzy badań wysunęli hipotezę, że jąderkowy czynnik lub czynniki wiążą się z miRNA, które się tam koncentrują, a następnie tworzą one kompleks z mRNA, aby po transporcie do cytoplazmy w bardzo krótkim czasie ulec translacji. Utworzenie kompleksu, w pewien sposób przyspiesza translację mRNA, które jest niezbędne komórce (Reyes-Gutierrez i wsp. 2014).

Dotychczas jedynymi ciałami jądrowymi, oprócz jąderka w których opisywano obecność poli(A) RNA w tym mRNA były speckles (NS). Uważa się że domeny te funkcjonują jako centra kontroli jakości, przez które wszystkie mRNA są transportowane i po przejściu kontroli jakości są one szybko i skutecznie eksportowane do cytoplazmy (Dias i wsp. 2010). W konsekwencji, mRNP zatrzymane są na terenie jądra, w NS, gdzie prawdopodobnie są zakotwiczone poprzez czynniki retencyjne. Jednym z sygnałów ukierunkowujących mRNP do NS jest domena bogata w argininę i serynę (RS), która została zlokalizowana w wielu białkach regulujących splicing, w tym w czynnikach, które prawdopodobnie odpowiadają za retencję mRNA w NS- U2AF65 i U1-70K, a także białkach SR (Hedley i wsp. 1995). Prawdopodobnie „znakują” one mRNA i ukierunkowują je do NS oraz fizycznie zakotwicząją poprzez interakcje z innymi fosforylowanymi białkami zawierającymi domenę RS (Wegener i Müller-McNicoll 2018).

7.6. Retencyjne mRNA ulegają translacji po eksporcie do cytoplazmy

Jednym z kluczowych pytań, pozostaje czy mRNA po retencji na terenie jądra komórkowego i eksporcie do cytoplazmy zachowuje swoją główną funkcję- ulega translacji. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy w mikrosporocytach modrzewia dochodzi do translacji mRNA, które eksportowane było do cytoplazmy, przeanalizowaliśmy pojedynczy cykl ekspresji genu kodującego białko wraz z analiza produktu białkowego kodowanego przez to mRNA. Do analizy wybrano rodzinę genów kodujących białka Sm. Analiza wykazała, że wzór rozmieszczenia mRNA kodującego białka Sm, jest ściśle skorelowany z lokalizacją jego produktu białkowego. Wraz z eksportem mRNA na teren cytoplazmy sukcesywnie wzrastał poziom białek Sm w tym kompartmentie co sugeruje, że nastąpiła translacja mRNA. W tym przypadku retencja mRNA kodujących białka Sm odgrywałaby ważną rolę w regulacji tempa eksportu i kontrolowania właściwego momentu translacji i biosyntezy białek Sm. Następnie białka transportowane są do jądra komórkowego, gdzie obserwowane były zarówno w nukleoplazmie i ciałach Cajala, gdzie prawdopodobnie uczestniczą w procesach montażu podjednostek spliceosomowych oraz splicingu. Podobną korelację zaobserwowano pomiędzy lokalizacją innego długoretencyjnego mRNA kodującego podjednostkę 10 polimerazy II RNA oraz jego produktu białkowego. Gdy obserwowano pojawienie się dużych ilości mRNA na terenie cytoplazmy, obserwowano także duże ilości nieufosforylowanej formy polimerazy II RNA (Smoliński i wsp., nieopublikowane).

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują, iż mRNA które uległo retencji na terenie jądra komórkowego, oraz eksportowi do cytoplazmy, przechodzi także wszystkie procesy kontroli jakości na terenie cytoplazmy, takie jak np. NMD (patrz rozdział 2.2.2.). mRNA po eksporcie do cytoplazmy nie są także prawdopodobnie transportowane do wyspecjalizowanych, nieoblionionych, bogatych w rybonukleoproteiny mikrodomen, nazywanych ciałami cytoplazmatycznymi (patrz rozdział 2.2.2., Moser i Fritzler 2010). Natomiast podlegają od razu procesowi translacji, aby na terenie komórki doszło do szybkiej biosyntezy białek niezbędnych na danym etapie rozwoju komórki.

Dane literaturowe wskazują, iż także u paproci *Marsilea vestita* podczas spermatogenezy, w spermatocytach, które są wyciszone transkrypcyjnie, nadal pojawiają się nowo zsyntetyzowane białka. Komórki wykorzystują mRNA, które zostało zsyntetyzowane we wcześniejszych etapach rozwoju i uległo retencji. Analiza western i northern oraz badanie *in*

in vivo translacji ujawniła trzy główne kategorie białek: (i) białka, które są obecne na stałym poziomie w całym okresie rozwoju, (ii) grupę białek, których poziom waha się w trakcie rozwoju i (iii) grupę białek, która jest niewykrywalna na początku rozwoju, ale ich poziom wzrasta podczas określonych etapów rozwoju komórki (Boothby i wsp. 2013).

Również u zwierząt, zaobserwowano białka, których poziom wzrasta w określonych etapach rozwoju np. w mysich komórkach linii płciowej. W komórkach tych wykazano obecność dużej ilości poliadenylowanych transkryptów, które ulegały retencji na terenie jądra w obrębie spermatocytów I rzędu. Po upływie około 9 dni od czasu detekcji poli(A) RNA, dokonano kolejnych pomiarów, które wykazały około 90% spadek ilości retencyjnych transkryptów na terenie jąder. W trakcie 9 dni, po których dokonano pomiaru, oraz zakończeniu podziałów mejotycznych, obserwowano komórki, które były już postmeiotycznymi komórkami spermatyd. Sugeruje to zatem, iż komórki podczas mejozy, charakteryzującym się wzmożoną aktywnością metaboliczną komórek, syntetyzują dużą ilość transkryptów podlegających retencji na terenie jądra. Transkrypty te zostaną wykorzystane dopiero po zakończeniu podziałów mejotycznych, czyli dopiero w obrębie spermatyd. W obrębie spermatyd dochodzi do uruchomienia mechanizmu postranskrypcyjnej obróbki, co prowadzi do powstania dojrzałych, ulegających eksportowi na teren cytoplazmy mRNA, oraz ich translacji (Naro i wsp. 2017).

7.7. Perspektywy

Nadal nie wiadomo, jakie czynniki/ grupy czynników odpowiedzialne są za transport oraz zatrzymanie transkryptów na terenie jądra komórkowego. Nasuwa się też pytanie jakie mechanizmy molekularne są odpowiedzialne za retencję transkryptów w domenach jądrowych takich jak CB i jąderko, oraz jaki ich składnik jest za to odpowiedzialny.

Kwestią otwartą pozostaje także jaki jest mechanizm rozpoznawania intronu retencyjnego i jakie czynniki regulują, jego późniejszy splicing. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki, wskazują, iż w zależności od zapotrzebowania komórki, retencji ulegają pewne grupy transkryptów metabolizmu podstawowego. mRNA transkrybowane są w okresach wysokiej aktywności transkrypcyjnej, ulegają retencji w nukleoplazmie i/lub domenach jądrowych, a następnie w określonym etapie rozwoju uwalniane są do cytoplazmy, gdzie podlegają translacji. W celu dokładniejszego zrozumienia tego procesu, należałoby jednak przeprowadzić kolejne badania. Niemniej jednak, wyniki przedstawione w niniejszej pracy

doktorskiej potwierdzają, że retencja mRNA na terenie jądra komórkowego stanowi potranskrypcyjny mechanizm regulacji ekspresji genów niezbędnych w kolejnych etapach rozwoju komórki. Dzięki temu komórka przygotowuje się do szybkiego uruchomienia wzmożonej aktywności metabolicznej, podczas czasowego wyciszenia genomu, podczas którego niezbędna jest translacja określonych transkryptów. Dzięki temu prawdopodobnie koordynuje zależne od siebie procesy dojrzewania i obróbki mRNA, oraz wpływa na czasowe rozdzielanie procesu transkrypcji, od translacji.

Podobieństwa w mechanizmach retencji mRNA na terenie jądra komórkowego występujące w różnych komórkach eukariotycznych, takich jak komórki drożdży, komórki roślinne, czy komórki zwierzęce, wskazuje, że jądro oraz domeny jądrowe mogą pełnić wiele funkcji, które nie stanowią ich głównego zadania. Proponujemy, że retencja na terenie nukleoplazmy, jak i domen jądrowych stanowi kolejny element skomplikowanej i dynamicznej maszyny koordynacji ekspresji genów, której zadaniem jest kierowanie losem mRNA w komórce. Niniejsze wyniki badań stanowią więc pierwsze doniesienie dotyczące retencji mRNA w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów w komórkach generatywnych u roślin nasiennych. Tworzą one podstawę do dalszych badań nad procesami i mechanizmami zaangażowanymi w dojrzewanie komórek linii generatywnej, a także podstawowych procesów w nich zachodzących.

8. PODSUMOWANIE

1. Retencja na terenie jądra komórkowego transkryptów kodujących białka stanowi nowy mechanizm regulacji ekspresji genów w komórkach generatywnych roślin nasiennych o pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej.
2. Transkrypty charakteryzują się różnym okresem retencji na terenie jądra komórkowego oraz miejscem ich gromadzenia.
3. Transkrypty o najdłuższym czasie retencji, przechowywane są zarówno w formie dojrzałej, jak i w formie niedojrzałej, z zachowaną/yymi sekwencjami intronowymi na terenie jądra komórkowego.
4. Retencja mRNA na terenie domen jądrowych, takich jak jąderko (mRNA i pre-mRNA) czy ciała Cajala (pre-mRNA) stanowi nową, nie opisywaną wcześniej rolę w regulacji ekspresji genów.
5. Transkrypty, które uległy retencji na terenie jądra komórkowego nie ulegają szybkiej degradacji, ale są eksportowane na teren cytoplazmy, gdzie prawdopodobnie ulegają translacji.
6. Retencja mRNA metabolizmu podstawowego w nukleoplazmie i domenach jądrowych związana jest ze zmianami aktywności transkrypcyjnej, które zależne są od stanu kondensacji chromatyny.
7. Otrzymane wyniki potwierdzają, że retencja mRNA na terenie jądra komórkowego stanowi potranskrypcyjny mechanizm regulacji ekspresji genów niezbędnych w kolejnych etapach rozwoju komórki. Proces ten może być związany z: (1) przygotowaniem komórki do szybkiego uruchomienia wzmożonej aktywności metabolicznej, (2) czasowym wyciszeniem genomu, podczas którego niezbędna jest translacja określonych transkryptów metabolizmu podstawowego, które ulegają ekspresji we wcześniejszym okresie aktywności transkrypcyjnej.

8. Niniejsze badania stanowią pierwsze doniesienia dotyczące retencji pre-mRNA w komórkach generatywnych roślin nasiennych.

WYKAZ RYCIN

- Ryc. 1 Modyfikacje domeny CTD podczas cyklu transkrypcyjnego.
- Ryc. 2 Proces czapczkowania końca 5' nowopowstającego transkryptu.
- Ryc. 3 Cykl tworzenia katalitycznie aktywnego spliceosomu.
- Ryc. 4 Mechanizm splicingu.
- Ryc. 5 Model biogenezy snRNA w komórkach ssaków.
- Ryc. 6 Etapy eksportu mRNA na teren cytoplazmy.
- Ryc. 7 Aktywność transkrypcyjna mikrosporocytów podczas diplotenu profazy I mejozy.
- Ryc. 8 Schemat protokołu przygotowania bibliotek cDNA do sekwencjonowania za pomocą zestawu Total RNA Seq Library Preparation Kit (Lexogen).
- Ryc. 9 Schemat protokołu przygotowania bibliotek cDNA do sekwencjonowania za pomocą zestawu TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant (Illumina).
- Ryc. 10 Przestrzenna dystrybucja poli(A) RNA w cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA.
- Ryc. 11 Poziom jądrowego i cytoplazmatycznego poli(A) RNA w czterech kolejnych stadiach cyklu.
- Ryc. 12 Lokalizacja aktywnej formy polimerazy II RNA w I stadium cyklu.
- Ryc. 13 Analiza jakościowa RNA (A) i cDNA (B) podczas przygotowywania bibliotek do sekwencjonowania.
- Ryc. 14 Analiza dystrybucji wyników BLAST pod względem gatunku.
- Ryc. 15 Adnotacja funkcjonalna mRNA.
- Ryc. 16 Analiza dystrybucji wyników BLAST pod względem gatunku mRNA znajdujących się na terenie cytoplazmy.
- Ryc. 17 Adnotacja funkcjonalna mRNA zlokalizowanych na terenie cytoplazmy.
- Ryc. 18 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA długoretencyjnych podczas cyklu.
- Ryc. 19 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA krótkoretencyjnych (retencja w 1 i 2 stadium-A) w cyklu.
- Ryc. 20 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA krótkoretencyjnych (retencja w 1 stadium-B) w cyklu.
- Ryc. 21 Przestrzenna i czasowa dystrybucja mRNA nieretencyjnych w cyklu.
- Ryc. 22 Analiza dystrybucji mRNA białek Sm w kolokalizacji z białkowym produktem-białkami Sm.

Ryc. 23 (A) Analiza ilościowa poziomu jądrowego i cytoplazmatycznego mRNA kodujący białka Sm w mikrosporocytach modrzewia podczas diplotenu, (B) Analiza korelacji pomiędzy transportem mRNA do cytoplazmy, a syntezą białka.

Ryc. 24 Poziom ekspresji mRNA kodującego białka Sm (SmG) mierzony metodą Real-time PCR.

Ryc. 25 Przestrzenna lokalizacja mRNA zawierających introny białek SmG, D2, D1 i podjednostki RPB10.

Ryc. 26 Przestrzenna i czasowa dystrybucja niedojrzałej formy mRNA białka SmG z zachowaną sekwencją pierwszego intronu w cyklu.

Ryc. 27 Przestrzenna i czasowa dystrybucja dojrzałej formy mRNA białka SmG w cyklu.

Ryc. 28 Przestrzenna i czasowa dystrybucja niedojrzałej formy mRNA podjednostki 10 polimerazy II RNA z zachowaną sekwencją intronową w cyklu.

Ryc. 29 Schemat czasu retencji oraz zaangażowania domen jądrowych mRNA podczas cyklu.

LITERATURA

1. Almeida SF, Garcia-Sacristan A, Custodio N, Carmo-Fonseca M (2010) A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Research* 38:8015–8026
2. Arkov AL, Ramos A (2010) Building RNA–protein granules: insight from the germline. *Trends in Cell Biology* 20:482–490
3. Askjaer P, Bachi A, Wilm M, Bischoff FR, Weeks DL, Ogniewski V, Ohno M, Niehrs C, Kjems J, Mattaj JW, Fornerod M (1999) RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Molecular and Cellular Biology* 19:6276–6285
4. Averbek N, Sunder S, Sample N, Wise JA, Leatherwood J (2005) Negative control contributes to an extensive program of meiotic splicing in fission yeast. *Mol Cell* 18:491-508.
5. Azimi M, Bulat E, Weis K, Mofrad MRK (2014) An agent-based model for mRNA export through the nuclear pore complex. *Molecular Biology of the Cell* 25:3643-3653
6. Beggs JD (2005) Lsm proteins and RNA processing. *Biochemical Society Transactions* 33:433–438.
7. Belostotsky DA, Rose AB (2005) Plant gene expression in the age of systems biology: integrating transcriptional and post-transcriptional events. *Trends Plant Sci.* 10:347-353
8. Bentley D (2002) The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Current Opinion in Cell Biology*, 14:336–342
9. Bergeron D, Pal G, Beaulieu YB, Chabot B, Bachand F (2015) Regulated intron retention and nuclear pre-mRNA decay contribute to PABPN1 autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 35:2503–2517
10. Boothby TC, Wolniak SM (2011) Masked mRNA is stored with aggregated nuclear speckles and its asymmetric redistribution requires a homolog of mago nashi. *Cell Biology* 12:45
11. Boothby TC, Zipper RS, van der Weele CM, Wolniak SM (2013) Removal of retained introns regulates translation in the rapidly developing gametophyte of *Marsilea vestita*. *Dev Cell.* 24:517-529

12. Bousquet-Antonelli C, Presutti C, Tollervey D (2000) Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102:765-775
13. Boutz PL, Bhutkar A, Sharp PA (2015) Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns. *Genes Dev.* 29:63–80.
14. Brandt A, Papagiannouli F, Wagner N, Wilsch-Brauninger M, Martina Braun M, Furlong EE, Loserth S, Wenzl Ch, Pilot F, Vogt N, Lecuit T, Krohne G, Großhans J (2006) Developmental Control of Nuclear Size and Shape by kugelkern and kurzkern. *Current Biology* 16:543–552
15. Brown TA (2001) Genomy. *Wydawnictwo Naukowe PWN SA*
16. Brugiolo M, Herzel L, Neugebauer KM (2013) Counting on co-transcriptional splicing. *Prime Rep.* 5: 9.
17. Burke TW, Kadonaga JT (1997) The downstream core promoter element DPE is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes & Development* 22: 3020-3031
18. Carmody SR, Wentz SR (2009) mRNA nuclear export at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 1933-1937
19. Carneiro T, Carvalho C, Braga J, Rino J, Milligan L, Tollervey D, Carmo-Fonseca M (2007) Depletion of the Yeast Nuclear Exosome Subunit Rrp6 Results in Accumulation of Polyadenylated RNAs in a Discrete Domain within the Nucleolus. *Molecular and Cellular Biology* 27:4157–4165
20. Casolari JM, Silver PA (2004) Guardian at the gate: preventing unspliced pre-mRNA export. *Trends in cell biology* 14:222-225
21. Chang DD, Sharp PA (1989) Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* 59:789–795
22. Cheng H, Dufu K, Lee CHS, Hsu JL, Dias A, Reed R (2006) Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. *Cell* 127:1389–1400
23. Choe J, Oh N, Park S, Lee YK, Song OK, Locker N, Chi SG, Kim YK (2012) Translation Initiation on mRNAs Bound by Nuclear Cap-binding Protein Complex CBP80/20 Requires Interaction between CBP80/20-dependent Translation Initiation Factor and Eukaryotic Translation Initiation Factor 3g. *The Journal of Biological Chemistry* 287, NO. 22:18500–18509
24. Ciejek EM, Nordstrom JL, Tsai MJ, O'Malley BW (1982) Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. *Biochemistry* 21:4945–4953

25. Cole ChN, Saavedra C (1997) Regulation of the export of RNA from the nucleus. *Cell & Developmental Biology* 8:71–78
26. Cole MD, Cowling VH (2008) Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nature Review Molecular Cell Biology* 9: 810-815
27. Cullen BR (2003) Nuclear RNA export. *Journal of Cell Science* 116:587-597
28. Darzacq X, Jády BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T (2002) Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO Journal* 21:2746–2756
29. Deeb F, Weele CM, Wolniak SM (2010) Spermidine Is a Morphogenetic Determinant for Cell Fate Specification in the Male Gametophyte of the Water Fern *Marsilea vestita*. *The Plant Cell* 22: 3678–3691
30. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2005) Escaping the nuclear confines: signal dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 122: 379-391
31. Dias AP, Dufu K, Lei H, Reed R (2010) A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains. *Nat Commun*. 1:97
32. Doma MK, Parker R (2007) RNA Quality Control in Eukaryotes. *Cell* 131:660-8
33. Dvir A (2002) Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577:208-223.
34. Erickson B, Sheridan RM, Cortazar M, Bentley D (2018) Dynamic turnover of paused Pol II complexes at human promoters. *Genes & Development* 32:1–11
35. Fay FS, Taneja KL, Shenoy S, Lifshitz L, Singer RH (1997) Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp Cell Res*. 231:27-37
36. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90:1023–1029
37. Fischer U, Sumpter V, Sekine M, Satoh T, Luhrmann R (1993) Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *EMBO Journal* 12:573–583
38. Fouqueau T, Werner F (2017) The architecture of transcription elongation. *Science* 357:871-872

39. Frey MR, Matera AG (2001) RNA-mediated interaction of Cajal bodies and U2 snRNA genes. *J Cell Biol.* 154:499-509
40. Garcia-Blanco MA (2003) Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *The Journal of Clinical Investigation* 112:474-480
41. Gonatopoulos-Pournatzis T, Cowling VH (2014) Cap-binding complex (CBC). *Biochemical Journal* 457:231–242
42. Gondran P, Amiot F, Weil D, Dautry F (1999) Accumulation of mature mRNA in the nuclear fraction of mammalian cells. *FEBS Lett.* 458:324–328
43. Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* 36:3420–3435
44. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29:644–652
45. Greenleaf AL (1993) Positive patches and negative noodles: linking RNA processing to transcription? *Trends Biochem Sci.* 18:117-119
46. Grosskortenhaus R, Robinson KJ, Doe1 CQ (2006) Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage. *Genes and development* 20:2618–2627
47. Grünberg S, Hahn S (2013) Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II *Trends in Biochemical Science* 38: 603-611
48. Hahn S (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 394- 403
49. Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T, Gerber AP (2008) Post-transcriptional gene regulation: From genome-wide studies to principles. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:798 – 813
50. Halpern KB, Caspi I, Lemze D, Levy M, Landen S, Elinav E, Ulitsky I, Itzkovitz S (2015) Nuclear Retention of mRNA in Mammalian Tissues. *Cell Reports* 13:2653-2662
51. Hastings ML, Krainer AR (2001) Pre-mRNA splicing In the New millennium. *Current Opinion In Cell Biology* 13:302-309
52. Hedley ML, Amreint H, Maniatis T (1995) An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11524-11528

53. Herman RC, Williams JG, Penman S (1976) Message and non-message sequences adjacent to poly(A) in steady state heterogeneous nuclear RNA of HeLa cells. *Cell* 7:429–437
54. Hermann H, Fabrizio P, Raker VA, Foulaki K, Hornig H, Brahms H, Lührmann R (1995) snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO Journal* 14:2076–88
55. Herzl L, Neugebauer KM (2015) Quantification of co-transcriptional splicing from RNA-Seq data. *Methods* 85:36–43
56. Hieronymus H, Silver PA (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev.* 18:2845-2860
57. Hirose Y, Manley JL (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & Development* 14:1415–1429
58. Hocine S, Singer RH, Grunwald D (2010) RNA Processing and Export. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2
59. Hollerer I, Grund K, Hentze MW, Kulozik AE (2014) mRNA 3'end processing: A tale of the tail reaches the clinic. *EMBO Molecular Medicine* 6:16-26
60. Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136:763-776
61. Hsin JP, Manley JL (2012) The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & Development* 26:2119–2137
62. Hyjek M, Wojciechowska N, Rudzka M, Kołowerzo-Lubnau A, Smoliński DJ (2015) Spatial regulation of cytoplasmic snRNP assembly at the cellular level. *Journal of Experimental Botany* 66:7019–7030
63. Hyjek M, Bajczyk M, Gołębiewski M, Nuc P, Kołowerzo-Lubnau A, Jarmołowski A, Smoliński DJ (2019) Core spliceosomal Sm proteins as constituents of cytoplasmic mRNAs in plants. bioRxiv doi.org/10.1101/709550
64. Iglesias N, Stutz F (2008) Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Letters* 582:1987-96
65. Inagaki S, Numata K, Kondo T, Tomista M, Yasuda K, Kanai A, Kageyama Y (2005) Identification and expression analysis of putative mRNA-like non-coding RNA in *Drosophila*. *Genes Cells* 10:1163–1173
66. Ishii K, Arib G, Lin C, Houwe G, Laemmli UK (2002) Chromatin Boundaries in Budding Yeast: The Nuclear Pore Connection. *Cell* 109:551–562

67. Izaurralde E, Adam S (1998) Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* 4:351–364
68. Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj LW (1994) A Nuclear Cap Binding Protein Complex Involved in Pre-mRNA Splicing. *Cell* 78:657-668
69. Jacob AG, Smith CW (2017) Intron retention as a component of regulated gene expression programs. *Hum. Genet.* 136:1043–1057.
70. Jády BE, Kiss T (2001) A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *EMBO Journal* 20: 541–551
71. Jarrous N, Reiner R, Wesolowski D, Mann H, Guerrier-Takada C, Altman S (2001) Function and subnuclear distribution of Rpp 21, a protein subunit of the human ribonucleoprotein ribonuclease P. *RNA* 7:1153-1164
72. Jurado AR, Tan D, Jiao X, Kiledjian M, Tong L (2014) Structure and Function of Pre-mRNA 5'-End Capping Quality Control and 3'-End Processing. *Biochemistry* 53:1882–1898
73. Kambach Ch, Walke S, Nagai K (1999) Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Current Opinion in Structural Biology* 9:222-230
74. Kim SH, Koroleva OA, Lewandowska D, Pendle AF, Clark GP, Simpson CG, Shaw PJ, Brown JWS (2009) Aberrant mRNA Transcripts and the Nonsense-Mediated Decay Proteins UPF2 and UPF3 Are Enriched in the Arabidopsis Nucleolus. *The Plant Cell* 21: 2045–2057
75. Kiss T (2004) Biogenesis of small nuclear RNPs. *Journal of Cell Science* 117: 5949–5951
76. Kołowerzo A, Smoliński DJ, Bednarska E (2009) Poly(A) RNA a New component of Cajal bodies. *Protoplasma* 236:13-19
77. Kołowerzo-Lubnau A, Świdziński M, Niedojadło J, Bednarska-Kozakiewicz E, Smolinski DJ (2015) Transcriptional activity of larch microsporocytes during diplotene with emphasis on the diffuse stage of meiosis. *PLoS One* 10:e0125647
78. Korzheva N, Mustaev A (2001) Transcription elongation complex: structure and function. *Current Opinion in Microbiology* 4:119-125
79. Krummel DAP, Nagai K, Oubridge Ch (2010) Structure of spliceosomal ribonucleoproteins. *Biology Reports* 2:39

80. Lamond AI, Spector DL (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Mol Cell Biol* 4:605-612
81. Lanfranco M, Vassallo N, Cauchi RJ (2017) Spinal Muscular Atrophy: From Defective Chaperoning of snRNP Assembly to Neuromuscular Dysfunction. *Front. Mol. Biosci.* 4:41
82. Lavut A, Raveh D (2012) Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genetics* 8
83. Lecuyer E, Yoshida H, Parthasarathy N, Alm Ch, Babak T, Cerovina T, Hughes TR, Tomancak P, Krause HM (2007) Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell* 131:174–187
84. Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein – coding genes. *Annual Review of Genetetics* 34: 77-137
85. Legrain P, Rosbash M (1989) Some *cis*- and *trans*-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 57:573-583
86. Lin DH, Correia AR, Cai SW, Huber FM, Jette CA, Hoelz A (2018) Structural and functional analysis of mRNA export regulation by the nuclear pore complex. *Nature Communications* 9:2319
87. Liu H, Luo M, Wen J (2014) mRNA stability in the nucleus. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*15:444-454
88. Lorković ZJ, Wicczorek Kirk DA, Lambermon MHL, Filipowicz W (2000) Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in plant science* 5:1360-1385
89. Lund MK, Guthrie CH (2005) The DEAD-Box Protein Dbp5p Is Required to Dissociate Mex67p from Exported mRNPs at the Nuclear Rim. *Molecular Cell* 20:645–651
90. Luo MJ, Reed R (1999) Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14937:14942
91. Machida K, Shigeta T, Yamamoto Y, Ito T, Svitkin Y, Sonenberg N, Imataka H (2018) Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. *Sci Rep* 8:17435
92. Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, Barton MK, Bartel DP (2004) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.* 23:3356-64
93. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression. *Genome Biology* 4:223

94. Mansilla A, Lopez-Sanchez C, dela Rosa EJ, Garcia-Martinez V, Martinez-Salas, E, de Pablo F, Hernandez-Sanchez C (2005) Developmental regulation of a proinsulin messenger RNA generated by intron retention. *EMBO Rep.* 6:1182-1187
95. Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & Development* 19:1512–1517
96. Matera G, Wang Z (2014) A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15:108–121
97. Mattaj JW (1986) Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* 46:905–911
98. Millhouse S, Manley JL (2005) The C-terminal domain of RNA polymerase II functions as a phosphorylation-dependent splicing activator in a heterologous protein. *Mol Cell Biol* 25:533-544
99. Morris GE (2008) The Cajal body. *Biochim Biophys Acta.* 1783: 2108-2115
100. Moser JJ, Fritzler MJ (2010) Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42:828–843
101. Mouaikel J, Narayanan U, Verheggen C, Matera AG, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R (2003) Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron. *EMBO Reports* 4:616–622
102. Naro CH, Jolly A, Di Persio S, Bielli S, Setterblad N, Alberdi AJ, Vicini E, Geremia R, De la Grange P, Sette C (2017) An orchestrated intron retention program in meiosis controls timely usage of transcripts during germ cell differentiation. *Dev Cell* 41: 82-93
103. Natalizio BJ, Wentz SR (2013) Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends in Cell Biology* 23:365-73
104. Ni Z, Schwartz BE, Werner J, Suarez JR, Lis JT (2004) Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 13:55-65
105. Nickless A, Bailis JM, You Z (2017) Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci.* 19:7-26.
106. Niedojadło J, Deleńko, Niedojadło K (2016) Regulation of poly(A) RNA retention in the nucleus as a survival strategy of plants during hypoxia. *RNA Biol.* 13:531–543
107. Niedojadło J, Kubicka E, Kalich B, Smoliński DJ (2014) Poly(A) RNAs including coding proteins RNAs occur in plant Cajal bodies. *PLoS One* 9:e111780

108. Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj JW (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101:187-198
109. Ohtani M (2018) Plant snRNP Biogenesis: A Perspective from the Nucleolus and Cajal Bodies. *Front. Plant Sci.* 8:2184
110. Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* 25:635-46
111. Patel SB, Bellini M (2008) The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Research* 36:6482–6493
112. Peck SA, Hughes KD, Victorino JF, Mosley AL (2019) Writing a wrong: Coupled RNA polymerase II transcription and RNA quality control. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7:e1529
113. Pei Y, Schwer B, Shuman S (2003) Interactions between Fission Yeast Cdk9, Its Cyclin Partner Pch1, and mRNA Capping Enzyme Pct1 Suggest an Elongation Checkpoint for mRNA Quality Control. *The Journal of Biological Chemistry* 278:7180–7188
114. Pfaffl MW (2004) Relative quantification. Chapter in: Real-time PCR. *International University Line*, 3:87–112
115. Picton H, Briggs D, Gosde R (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145:27–37
116. Plessel G, Fischer U, Lührmann R (1994) m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Molecular and Cellular Biology* 14:4160–72
117. Pontes O, Pikaard CS (2008) siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet* 18:197-203
118. Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL (2005) Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123:249-263
119. Price D (2000) P-TEFb, a Cyclin-Dependent Kinase Controlling Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* 20:2629–2634
120. Proudfoot N (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends in Biochemical Science* 25:290-293

121. Qu X, Lykke-Andersen S, Nasser T, Saguez C, Bertrand E, Jensen TH, Moore C (2009) Assembly of an export-competent mRNP is needed for efficient release of the 3'-end processing complex after polyadenylation. *Mol Cell Biol* 29:5327-38
122. Raker VA, Plessel G, Lührmann R (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle *in vitro*. *EMBO Journal* 15:2256–2269
123. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH (2016) mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research* 44:7511–7526
124. Reed R (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology* 15:326-331
125. Reyes-Gutierrez P, Politz JCR, Pederson T (2014) A mRNA and Cognate MicroRNAs Localize in the Nucleolus. *Nucleus* 5:636-642
126. Richard P, Manley JL (2009) Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & Development* 23:1247–1269
127. Richter JD (2007) CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci.* 32:279-85
128. Rissland OS (2017) The organization and regulation of mRNA–protein complexes. *RNA* 8
129. Rodriguez-Navarro S, Fischer T, Luo MJ, Antunez O, Brettschneider S, Lechner J, Perez-Ortin JE, Reed R, Hurt E (2004) Sus1, a Functional Component of the SAGA Histone Acetylase Complex and the Nuclear Pore-Associated mRNA Export Machinery. *Cell* 116:75–86
130. Rodriguez-Navarro S, Hurt E (2011) Linking gene regulation to mRNA production and export. *Current Opinion in Cell Biology* 23:302–309
131. Ross DA, Yen RW, Chae CB (1982) Association of globin ribonucleic acid and its precursors with the chicken erythroblast nuclear matrix. *Biochemistry* 21:764–771
132. Saguez C, Schmid M, Olesen JR, Ghazy MA, Qu X, Poulsen MB, Nasser T, Moore C, Jensen TH (2008) Nuclear mRNA Surveillance in THO/sub2 Mutants Is Triggered by Inefficient Polyadenylation. *Molecular Cell* 31:91–103
133. Saldi T, Cortazar MA, Sheridan RM, Bentley DL (2016) Coupling of RNA polymerase II transcription elongation with pre-mRNA splicing. *J Mol Bio* 428:2623-2635
134. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB (2008) Proliferating cells express mRNA with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA targeted sites. *Science* 320:1643-1647

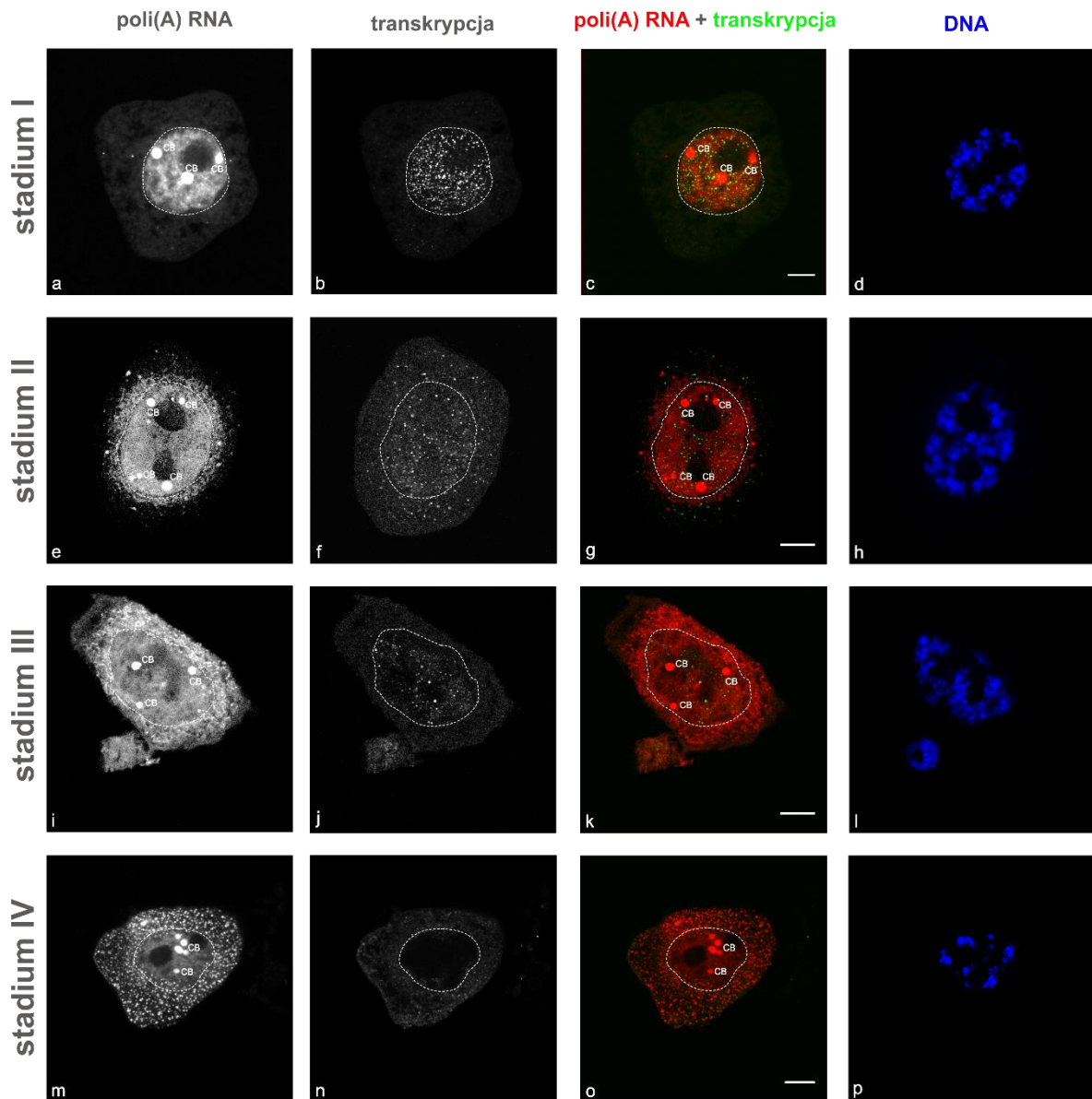
135. Saunders A, Core LJ, Lis JT (2006) Breaking barriers to transcription Elongation. *Nature Review Molecular Cell Biology* 7:557-67
136. Schaefer B, Sun W, Li YS, Fang L, Chen W (2018) The evolution of posttranscriptional regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 31:e1485
137. Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863-4
138. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9:671-675
139. Scofield DG, Lynch M (2008) Evolutionary diversification of the Sm family of RNA-associated proteins. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2255-2267
140. Shaw PJ, Brown JW (2004) Plant nuclear bodies. *Curr Opin Plant Biol.* 7:614-20
141. Sidebottom E, Harris H (1969) The role of the nucleolus in the transfer of RNA from nucleus to cytoplasm. *J. Cell Sci.* 5:351-364
142. Sikorski TW, Buratowski S (2009) The Basal Initiation Machinery: Beyond the General Transcription Factors. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 344-351
143. Šimková E, Staněk D (2012) Probing Nucleic Acid Interactions and Pre-mRNA Splicing by Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 14929-14945
144. Skruzny M, Schneider C, Racz A, Weng J, Tollervey D, Hurt E (2009) An Endoribonuclease Functionally Linked to Perinuclear mRNP Quality Control Associates with the Nuclear Pore Complexes. *PLoS Biology* 7:e8
145. Smith KP, Jeanne Bentley Lawrence JB (2000) Interactions of U2 Gene Loci and Their Nuclear Transcripts with Cajal (Coiled) Bodies: Evidence for Pre-U2 within Cajal Bodies. *Molecular Biology of the Cell* 11:2987-2998
146. Smoliński DJ, Kołowerzo A (2012) mRNA accumulation in the Cajal bodies of the diplotene larch microsporocyte. *Chromosoma* 121:37-48
147. Smoliński DJ, Niedojadło J, Noble A, Górská-Brylass A (2007) Additional nucleoli and NOR activity during meiotic prophase I in larch (*Larix decidua* Mill.). *Protoplasma* 232:109-120
148. Smoliński DJ, Wróbel B, Noble A, Zienkiewicz A, Górská-Brylass A (2011) Periodic expression of Sm proteins parallels formation of nuclear cajal bodies and cytoplasmic snRNP-rich bodies. *Histochemistry and Cell Biology* 136:527-541
149. Smoliński DJ, Wróbel B, Zienkiewicz K, Niedojadło J (2003) Organizacja systemu splicingowego w komórkach linii generatywnej. *Kosmos* 4:481-492

150. Stewart M (2010) Nuclear export of mRNA. *Trends in Biochemical Science* 35:609-617
151. Stiller JW, Hall BD (2002) Evolution of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6091-6096
152. Strässer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondón AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417:304-308
153. Struhl K (1996) Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription. *Cell* 84: 179 – 182
154. Susor A, Jansova D, Anger M, Kubelka M (2015a) Translation in the mammalian oocyte in space and time. *Cell Tissue Res* 363:69-84
155. Susor A, Jansova D, Cerna R, Danylevska A, Anger M, Toralova T, Malik R, Supolikova J, Cook MS, Oh JS, Kubelka M (2015b) Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. *Nat Commun* 6:6078
156. Taddei A (2007) Active genes at the nuclear pore complex. *Current Opinion in Cell Biology* 19:305–310
157. Takemura R, Takeiwa T, Taniguchi I, McCloskey A, Ohno M (2011) Multiple factors in the early splicing complex are involved in the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells. *Genes Cells* 16:1035-49
158. Toma KG, Rebbapragada I, Durand S, Lykke-Andersen J (2015) Identification of elements in human long 3' UTRs that inhibit nonsense-mediated decay. *RNA* 21:887-897
159. Törö I, Thore S, Mayer C, Basquin J, Séraphin B, Suck D (2001) RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *EMBO Journal* 20:2293–2303
160. Tupy J (1982) Alterations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination. *Biol Plant* 24:331–340
161. Tutucci E, Stutz F (2011) Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:377–384
162. Urlaub H, Raker VA, Kostka S, Lührmann R (2001) Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *EMBO Journal* 20:187–196

163. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE (2009) A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323:644-648
164. Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I (2011) RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3
165. Wagner EJ, Marzluff WF (2006) ZFP100, a component of the active U7 snRNP limiting for histone premRNA processing, is required for entry into S phase. *Mol Cell Biol* 26:6702-6712
166. Wang Z, Burge Ch (2008) Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14:802–813
167. Washburn RS, Gottesman ME (2015) Regulation of transcription elongation and termination. *Biomolecules* 5:1063-78
168. Wegener M, Müller-McNicoll M (2018) Nuclear retention of mRNAs - quality control, gene regulation and human disease. *Semin Cell Dev Biol.* 79:131-142
169. Weil D, Boutain S, Audibert A, Dautry F (2000) Mature mRNAs accumulated in the nucleus are neither the molecules in transit to the cytoplasm nor constitute a stockpile for gene expression. *RNA* 6:962–975
170. Weill L, Belloc E, Bava FA, Mendez R (2012) Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 19: 577–585
171. Wentz SR, Rout MP (2010) The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2
172. Wickramasinghe VO, Laskey RA (2015) Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16:431-442
173. Will CL, Lührmann R (2011) Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3
174. Woychik NA, Hampsey M (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108: 453-463
175. Xie SQ, Pombo A (2006) Distribution of different phosphorylated forms of RNA polymerase II in relation to Cajal and PML bodies in human cells: an ultrastructural study. *Histochemistry and Cell Biology* 125:21-31
176. Xu J, Chua NH (2009) Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell.* 21:3270-3279

177. Yang Ch., Hager PW, Stiller JW (2014) The identification of putative RNA polymerase II C-terminal domain associated proteins in red and green algae. *Transcription* 5(5): e970944
178. Yap K, Lim ZQ, Khandelia P, Friedman B, Makeyev EV (2012) Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention. *Genes Dev.* 26:1209–1223.
179. Yonaha M, Proudfoot NJ (2000) Transcriptional termination and coupled polyadenylation in vitro. *EMBO Journal* 19:3770-3777
180. Yoshimoto R, Kaida D, Furuno M, Burroughs AM, Noma S, Suzuki H, Kawamura Y, Hayashizaki Y, Mayeda A, Yoshida M (2017) Global analysis of pre-mRNA subcellular localization following splicing inhibition by spliceostatin A. *RNA* 23:47–57.
181. Zhao S, Fernald RD (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* 12: 1047-1064
182. Zienkiewicz K, Smoliński DJ, Bednarska E (2006) Distribution of poly(A) RNA and splicing machinery elements in mature *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing in vitro. *Protoplasma* 227:95–103
183. Zieve GW, Khusial PR (2003) The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology. *Autoimmunity Reviews* 2:235-240
184. Zieve GW, Sauterer RA, Feeney RJ (1988) Newly synthesized small nuclear RNAs appear transiently in the cytoplasm. *Journal of Molecular Biology* 199:259–267
185. Zorio D, Bentley D (2004) Between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Experimental Cell Research* 296:91– 97

SUPPLEMENTY



Supl. 1 -Przestrzenna i czasowa dystrybucja poli(A) RNA w cyklu syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA w korelacji z aktywnością transkrypcyjną de novo. I– IV - Kolejne stadia cyklu poli(A) RNA w komórce. CB – ciało Cajala. Skala 10 μ m.

Supl. 2 -płyta CD. Lista wybranych transkryptów wyizolowanych podczas czwartego stadium syntezy, gromadzenia i transportu poli(A) RNA i ich adnotacja funkcjonalna.

Supl. 3 -płyta CD. Pełna lista transkryptów znajdujących się na terenie cytoplazmy i ich adnotacja funkcjonalna.