

Temat pracy: Charakterystyka metabolizmu RNA podczas odróżnicowania komórek mezofilowych *Arabidopsis thaliana*

STRESZCZENIE

Od kiedy zespołowi Takebe i wsp. w 1971 udało się odtworzyć całą roślinę tytoniu z jednego protoplastu w tzw. systemie protoplast-to-plant, procedura ta zdobyła dużą popularność w biotechnologii roślin m. in. dzięki możliwości tworzenia nowych odmian przez hybrydyzację somatyczną. Pierwszym i najbardziej limitującym w tym systemie etapem jest odróżnicowanie komórek, indukowane usunięciem ściany komórkowej. Pomimo wielu prac wykorzystujących protoplasty jako obiekt różnego typu badań podstawowych jak i aplikacyjnych wiedza na temat molekularnych mechanizmów odróżnicowania komórek roślin od momentu izolacji protoplastów po ich pierwsze podziały komórkowe jest niewielka. Dlatego celem niniejszej pracy było: 1) poznanie poziomu aktywności transkrypcyjnej genomu, ze szczególnym uwzględnieniem transkrypcji prowadzonej przez polimerazę II RNA podczas kolejnych etapów odróżnicowania, oraz 2) określenie jaka jest funkcja w tym procesie potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przez miRNA. Materiał badawczy stanowiły liście *Arabidopsis thaliana*, izolowane z nich protoplasty oraz hodowane komórki pochodzące z protoplastów.

W niniejszej pracy wykazano, że izolacja protoplastów, pomimo dekondensacji chromatyny, powoduje 8,5-krotny spadek intensywności transkrypcji prowadzonej przez polimerazę II RNA. W tym okresie obserwowano także zmniejszenie się ilości 25S rRNA w jąderku wskazujące na obniżenie także aktywności polimerazy I RNA. Chwilowe zatrzymanie/obniżenie syntezy RNA może mieć związek ze zmianą profilu transkrypcji będącą konsekwencją wyłączenia ekspresji genów mezofilowych i nabywaniu przez protoplasty totipotencji. Zjawisko to, obserwowane w niniejszej pracy na poziomie komórkowym, może być kluczowe dla odróżnicowania komórek roślin. W kolejnych stadiach dedyferencjacji ma miejsce intensywne usuwanie transkryptów 25S rRNA i poli(A) RNA z cytoplazmy. Proces ten – określany czyszczeniem cytoplazmy – prowadzi do usunięcia transkryptów rybosomalnych oraz kodujących białka pochodzących jeszcze z komórek mezofilowych.

W późniejszych stadiach, przed mającymi nastąpić podziałami komórkowymi, ilość badanych transkryptów wzrastała sekwencyjnie, w cytoplazmie najpierw pojawiały się cząsteczki 25S rRNA, a następnie poli(A) RNA. Tym samym po włączeniu nowego wzorca

ekspresji, prowadzącego do odróżnicowania, nowo syntetyzowany mRNA ulega translacji na nowo powstałym aparacie translacyjnym.

Następnie postawiono pytanie jaką funkcję w procesie odróżnicowania komórek roślin ma potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów z udziałem miRNA. Badania obejmujące pomiary ilości i dystrybucji białka AGO1 (białko kompleksu RISC biorącego udział w wyciszaniu mRNA przez miRNA) w jądrze i cytoplazmie, ciał jądrowych typu D-bodies (miejsca obróbki pri-miRNA) oraz porównanie śmiertelności mutantu *dcl1-9* (DCL1 – białko niezbędne do egzonukleolitycznej obróbki pri-miRNA i powstania dojrzałych miRNA) z roślinami typu wt wykazały, że regulacja ekspresji genów z udziałem miRNA jest niezbędna podczas odróżnicowania, szczególnie w okresie podziałów komórkowych. Dodatkowo sekwencjonowanie mikrotranskryptomu wykazało, że w porównaniu do komórek mezofilowych liści, w protoplastach deregulacji ulega tylko 5%, natomiast w stadium podziałów komórkowych ponad 25% eksprymowanych miRNA.

Analiza mikrotranskryptomu protoplastów oraz pochodzących z nich hodowanych komórek, wykazała ważną rolę miR319 oraz miR396 w regulacji pierwszych podziałów komórek roślin podczas odróżnicowywania. Potwierdziły to badania wykazujące wyższą śmiertelność oraz niższą intensywność podziałów hodowanych komórek pochodzących z protoplastów uzyskanych z liści mutantu *Amir319b*.

Na podstawie zmian ilości odczytów poszczególnych miRNA wykazano także, że istotne znaczenie w procesie odróżnicowania może mieć stres oksydacyjny (miR398), szlaki sygnałowe z udziałem auksyn (miR390) i mechanizmy utrzymywania totipotencji hamujące różnicowanie komórek (miR396a i miR164). Opierając się na uzyskanych wynikach miR319, miR390 i miR398 wydają się być kluczowe w procesie odróżnicowania i mogą stać się obiektem manipulacji genetycznych, w celu zwiększenia efektywności procesu regeneracji roślin z protoplastów.

Detektiv