

Droga od genu do białka w komórkach eukariotycznych jest długa i skomplikowana. Gen (sekwencja DNA) jest przepisywany na pierwotny transkrypt (pre-mRNA), który następnie ulega modyfikacjom i dojrzewaniu, stając się matrycowym RNA (mRNA). Uzyskany w ten sposób mRNA jest transportowany do cytoplazmy, gdzie zostaje przepisany na białko. Ilość i rodzaj tworzonych w organizmie białek zmienia się jednak cały czas w zależności od ciągle zmieniających się potrzeb. Z tego powodu niezwykle ważna jest precyzyjna i ścisła regulacja ekspresji genów, która w komórkach eukariotycznych może być regulowana na wielu poziomach. Jedną z możliwych regulacji jest włączenie przepisywania danego genu z DNA na pre-mRNA, prowadzące do powstania potrzebnego białka. Drugą możliwością jest zatrzymanie przepisywania genu z DNA na pre-mRNA, co powoduje, że białko kodowane przez ten gen nie powstanie. Innym rodzajem regulacji jest degradacja istniejącego już mRNA przez krótkie (21-nukleotydowe) jednoniciowe cząsteczki RNA, zwane mikroRNA (miRNA), które posiadają sekwencję komplementarną do danego mRNA. Dzięki tej komplementarności miRNA wiążą się do danego mRNA i prowadzą do jego degradacji. Warto dodać, jak ważna dla organizmu jest regulacja ekspresji genów przez miRNA. Dla roślin kompletne wyłączenie ścieżki odpowiedzialnej za ich powstawanie powoduje śmierć rośliny na etapie embrionalnym. Natomiast częściowa deregulacja tego procesu skutkuje defektami w licznych organach roślinnych, jak również często prowadzi do braku płodności.

Dojrzałe miRNA są krótkie (20-22nt), ale wycinane w 2 etapach przez białko Dicer-like 1 (DCL1) z długich pierwotnych prekursorów (pri-miRNA). Pri-miRNA zawiera strukturę spinki do włosów, w której osadzona jest sekwencja miRNA. DCL1 do wydajnego i precyzyjnego cięcia pri-miRNA potrzebuje innych czynników, z których najważniejszymi są białka HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) i SERRATE (SE). Powszechna wiedza sugeruje, że SE i HYL1 są ważne dla utrzymania struktur drugorzędowych RNA w prekursorach miRNA w celu utrzymania wysokiej aktywności cięcia przez DCL1. Jednak w niektórych warunkach (rośliny uprawiane w niższych temperaturach) DCL1 może być bardziej niezależny od SE i HYL1. Oprócz faktu, że białka te są ważne dla precyzji działania DCL1, nie ma danych na temat roli SE i HYL1 w formowaniu drugorzędowej struktury prekursora miRNA.

Pytanie, jak białka te wpływają na strukturę drugorzędową prekursorów, jest ważne dla zrozumienia całego procesu biogenezy miRNA. Jest to jeszcze bardziej intrygujące w przypadku białka SE, gdyż w dwóch najczęstszych mutantach *serrate: se-1 i se-2*, w których powstaje białko SE skrócone odpowiednio o 27 i 40 aminokwasów (aa), zaobserwowano ogólną redukcję miRNA i nieprawidłowe cięcie przez DCL1. Jednak SE powstające w tych mutantach nadal może oddziaływać z HYL1, DCL1 i RNA, co pozwala nam zadać pytania: Czy interakcja SE z HYL1 i DCL1 jest ważna dla biogenezy miRNA? Jaka jest rola ostatnich 27aa SE (najbardziej zakonserwowanej części białka) na strukturę drugorzędową pri-miRNA? Nasze poprzednie wyniki wykazały, że kompleks THO/TREX jest silnie związany z SERRATE *in vivo*. Wyniki innych grup wykazały również, że THO może być ważne dla stabilizacji struktury drugorzędowej pri-miRNA i wiązania się białka HYL1 do pri-miRNA. Do tej pory rola kompleksu THO/TREX w biogenezie miRNA jest niejasna, a rola interakcji między SE i THO/TREX w biogenezie miRNA nigdy nie została potwierdzona. **Głównym celem tego projektu jest zrozumienie roli SERRATE w zmianie drugorzędowych struktur prekursorów miRNA i wpływ tych zmian dla aktywności DCL1. Aby lepiej zrozumieć ten proces, chcielibyśmy zrozumieć rolę zakonserwowanej części SE (ostatnich 27aa) oraz rolę kompleksu THO/TREX na strukturę pri-miRNA oraz na aktywność białka DCL1 w procesie biogenezy miRNA.**

W projekcie tym chcielibyśmy zaproponować serię eksperymentów mających na celu analizę *in vivo* struktury drugorzędowej pri-miRNA, a także sprawdzenie, jaka jest różnica między strukturami drugorzędowymi prekursorów miRNA wydajnie i niewydajnie ciętymi przez DCL1. W celu badania struktury drugorzędowej pri-miRNA będziemy wykorzystywać metodę DMS-MaPseq. DMS modyfikuje tylko nukleotydy znajdujące się w jednoniciowych rejonach RNA. Połączenie tego odczynnika ze specjalną metodą przygotowania materiału do sekwencjonowania nowej generacji, pozwala określać rejony jedno- i dwuniciowe w badanych RNA. Zadamy również pytanie, jak struktury drugorzędowe prekursorów miRNA zmieniają się u mutantów *hyl1* i *se* w normalnych warunkach wzrostu (22°C), ale także gdy rośliny są uprawiane w niższych temperaturach (16°C), a także w wyższych (28°C). Sprawdzimy również, jak ważna jest interakcja między SE a HYL1 i DCL1. Korzystając z metody dokowania molekularnego przewidzieliśmy, które reszty są ważne dla interakcji między SE i HYL1/DCL1. Korzystając z tych informacji, stworzymy rośliny transgeniczne, w których powstaje SE niezdolne do interakcji z HYL1/DCL1 i sprawdzimy wydajność biogenezy miRNA w tych roślinach. Ponadto sprawdzimy jaką rolę odgrywa ostatnie 27 wysoce zakonserwowanych aminokwasów SE dla struktury drugorzędowej prekursora miRNA i oddziaływań z innymi białkami. W trzeciej części projektu planujemy sprawdzić rolę oddziaływania SE i THO/TREX dla biogenezy miRNA, a także w stabilizacji struktury drugorzędowej prekursorów miRNA.