

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN
PRACOWNIA BIOLOGII MOLEKULARNEJ RO LIN

Martyna Nowacka

PRODUKTY DEGRADACJI RNA JAKO POTENCJALNE
CZ STECZKI REGULATOROWE I BIOMARKERY
UMOLIWIAJĄCE ANALIZ ZMIAN ZACHODZĄCYCH W
KOMÓRCY RO LINNEJ

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Marek Figlerowicz

Poznań 2009

Składam serdeczne podziękowania

Panu Prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi
za umożliwienie wykonania niniejszej pracy,
za wszechstronną pomoc w jej przygotowaniu,
merytoryczny nadzór i wyrozumiałość,

Panu dr Pawłowi Stróżyckiemu
za cenne rady dotyczące treści merytorycznych
za poświęcony czas i przekazaną wiedzę.

Dziękuję za dobrą współpracę i miłe towarzystwo
koleżankom i kolegom z Pracowni Biologii Molekularnej Rolin
oraz Zespołu Wirusologii Molekularnej,
a także wszystkim innym,
którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

SPIS TRE CI

I. WST P.....	8
I.1. Klasyfikacja RNA	8
I.1.1. Koduj ce RNA	9
I.1.2. Niekoduj ce RNA	10
I.1.2.1. Konstytutywne RNA	10
I.1.2.2. Regulatorowe RNA	12
I.1.2.2.1. Du e regulatorowe RNA	12
I.1.2.2.2. Ma e regulatorowe RNA	16
Biogeneza i funkcje miRNA.....	19
Biogeneza i funkcje siRNA	23
Biogeneza i funkcje ta-siRNA.....	24
Biogeneza i funkcje nat-siRNA.....	25
Biogeneza i funkcje rasiRNA i piRNA	26
I.1.2.3. Niekoduj ce RNA jako biomarkery	27
I.2. Degradacja RNA	28
I.2.1. Kofaktory wspomagaj ce degradacj RNA	29
I.2.1.1. Helikazy	29
I.2.1.2. Polimerazy.....	30
I.2.1.3. Bia ka opieku cze	30
I.2.2. Ró nice pomi dzy degradacj RNA z udziałem egzonukleaz 5' i 3'	31
I.2.3. Mechanizmy degradacji zale ne od syntezy i dojrzewania cz steczek RNA	32
I.2.3.1. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol I.....	32
I.2.3.2. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol II	33
I.2.3.3. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol III	38
I.2.3.4. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol IVa i IVb	41
I.2.4. Dlaczego degradacja RNA jest bardzo efektywna?	41
II. CEL PRACY	42
III. MATERIAŁY	43
III.1. Szczepy bakteryjne	43
III.2. Materiał ro linny.....	43

III.3. Gotowe zestawy odczynników	43
III.4. Enzymy	44
III.5. Oligonukleotydy	44
III.6. Wzorce długości RNA i DNA	46
III.7. Ele poliakrylamidowe (PAA)	46
III.8. Odczynniki	47
III.9. Bufory	48
III.10. Pożywki do hodowli bakterii	50
III.11. Pożywka stosowana do podlewania roślin łubinów	50
IV. METODY	52
IV.1. Hodowla <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
IV.2. Hodowla łubinów	52
IV.3. Elektroforeza dwukierunkowa RNA w gelach PAA (2D-E)	53
IV.3.1. Izolacja RNA	53
IV.3.2. Znakowanie RNA na końcu 5'	53
IV.3.3. Elektroforeza w pierwszym kierunku.....	54
IV.3.4. Elektroforeza w drugim kierunku.....	54
IV.4. Pozyskanie materiału do konstrukcji pełnej biblioteki RNA18-73	54
IV.4.1. Izolacja całkowitego RNA	54
IV.4.2. Oczyszczanie RNA metodą fenol-chloroform	55
IV.4.3. Wstępne frakcjonowanie całkowitego RNA za pomocą urządzenia <i>Flash PAGE fractionator</i> firmy Ambion	55
IV.4.4. Oczyszczanie frakcji 18 - 73 nt RNA (RNA18-73) metodą elektroforetyczną ..	56
IV.5. Ogólne zasady konstrukcji pełnej biblioteki RNA18-73	56
IV.6. Ogólne zasady konstrukcji biblioteki RNA70	57
IV.7. Konstrukcja bibliotek cDNA (identyczna dla obu bibliotek)	57
IV.7.1. Przyłączenie oligomeru do końca 3' cz. steczek RNA.....	57
IV.7.2. Przyłączenie oligomeru do końca 5' cz. steczek RNA.....	58
IV.7.3. Odwrotna transkrypcja - I.....	58
IV.7.4. Odwrotna transkrypcja - II (opcja alternatywna bez przyłączenia oligomeru do końca 5')	59
IV.7.5. Amplifikacja cDNA	59

IV.7.6. Trawienie restrykcyjne cz steczek cDNA	60
IV. 7.7. Ł czenie produktów trawienia cDNA w „konkatamery”	60
IV.7.8. Wprowadzanie cDNA do plazmidu pCR 2.1-TOPO	61
IV.7.9. Transformacja bakterii	61
IV.7.10. Izolacja plazmidowego DNA	62
IV.7.11. Analiza klonów bakteryjnych.....	62
IV. 7.12. Sekwencjonowanie.....	63
IV.8. Klonowanie indywidualnych cz steczek RNA izolowanych z elu.....	64
IV.8.1. Poliadenylacja ko ca 3' cz steczek RNA	64
IV.8.2. Trawienie restrykcyjne cz steczek cDNA oraz plazmidu pUC19	64
IV.8.3. Wprowadzanie cDNA do plazmidu pUC19.....	65
IV.8.4. Transformacja bakterii	65
IV.9. Hybrydyzacja typu Dot blot.....	65
IV.9.1. Elektrotransfer	65
IV.9.2. Prehybrydyzacja	66
IV.9.3. Przygotowanie sond DNA.....	66
IV.9.4. Hybrydyzacja.....	67
IV.9.5. Odplukiwanie	67
V. WYNIKI	68
V.1. Analiza degradomu RNA	68
V.1.1. Optymalizacja techniki dwukierunkowej elektroforezy (2D-E) RNA – badania modelowe.....	69
V.1.2. Analiza 2D-E frakcji krótkich RNA z <i>A. thaliana</i>	73
V.1.2.1. Optymalizacja warunków analizy frakcji krótkich RNA z <i>A. thaliana</i>	73
V.1.2.2. Polimorfizm frakcji krótkich RNA z <i>A. thaliana</i>	75
V.1.2.3 Analiza frakcji krótkich RNA z ró nych organów <i>A. thaliana</i>	76
V.1.3. Analiza jako ciowa frakcji krótkich RNA z li ci <i>A. thaliana</i>	77
V.1.3.1 Konstrukcja biblioteki RNA18-73.....	78
V.1.3.2 Uzyskanie biblioteki RNA70.....	80
V.1.3.3 Identyfikacja pojedynczych cz steczek z frakcji krótkich RNA.....	82
V.1.4. Analiza bioinformatyczna degradomu RNA	85
V.1.4.1 Wst pna analiza składu degradomu	85
V.1.4.2. Produkty degradacji rRNA	87

V.1.4.3. Produkty degradacji tRNA	93
V.1.4.4. Produkty degradacji mRNA	101
V.1.4.5. Produkty degradacji związane z biogenez małych niekodujących RNA i transkryptów pochodzących z rejonów mitochondriogenowych	105
V.1.5. Identyfikacja sekwencji komplementarnych do stabilnych produktów degradacji	109
V.2. Wpływ czynników endo- i egzogennych na skład degradomu RNA.....	113
V.2.1. Deficyt małych regulatorowych RNA jako czynnik endogenny wpływający na skład degradomu.....	113
V.2.2. Stres osmotyczny jako czynnik egzogenny wpływający na skład degradomu...	116
V.3. Analiza Zmian zachodzących w degradomie RNA podczas procesów rozwojowych	117
VI. DYSKUSJA.....	120
VI.1. Wstępne badania metodologiczne.....	121
VI.2. Wstępna analiza krótkich RNA występujących w komórkach roślinnych	122
VI.3. Identyfikacja cząstek tworzących degradom RNA	123
VI.4. Funkcja zidentyfikowanych degradantów RNA	126
VI.5. Produkty degradacji jako potencjalne cząsteczki regulatorowe	137
VI.6. Produkty degradacji RNA jako biomarkery zmian zachodzących w komórce pod wpływem endo- i egzogennych czynników.....	138
VI.7. Zmiany w degradomie RNA uwarunkowane rozwojem brodawki korzeniowej <i>Lupinus luteus</i>	140
VII. PODSUMOWANIE.....	143
VIII. STOSOWANE SKRÓTY	144
IX. LITERATURA	146
X. ZAŁĄCZNIKI	156

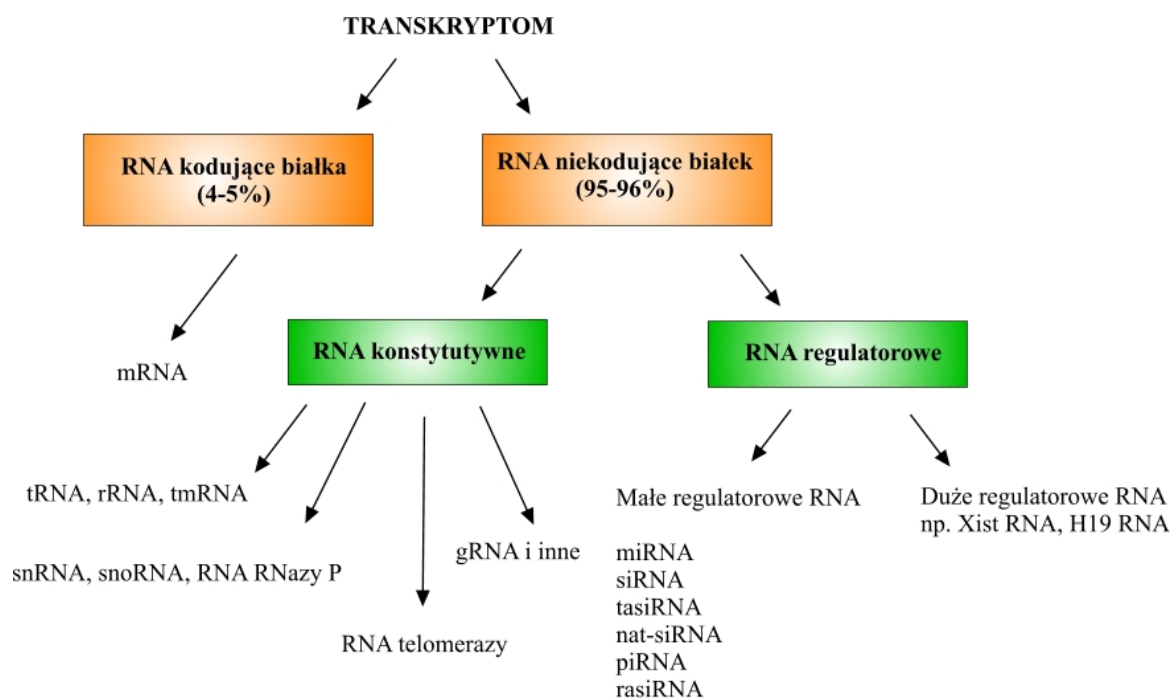
I. WST P

Jeszcze do niedawna powszechnie s dzono, e cz steczki RNA pełni w komórce jedynie drugoplanowe funkcje: przeka nika informacji genetycznej (mRNA), adaptora w procesie translacji (tRNA) czy szkieletu spajaj cego białka (rybosom, spliceosom). Schemat, za pomoc którego próbowano opisa podstawowe procesy zachodz ce we wszystkich organizmach ywych, koncentrował si przede wszystkim na DNA, jako no niku informacji genetycznej oraz białkach stanowi cych produkty ko cowe ekspresji genów. To wła nie białkom przypisywano wszystkie funkcje budulcowe, katalityczne i regulatorowe. Do rewizji tych e pogl dów zmusiły nas dokonane w ostatnich latach odkrycia: zjawiska interferencji RNA (RNAi) oraz szeregu nowych klas tzw. regulatorowych RNA. Nie koduj one białek, a mimo to pełni w komórce wiele istotnych funkcji. Okazało si , e zarówno u zwierz t, jak i ro lin, rejony koduj ce białka stanowi zwykle tylko niewielk cz genomu, si gaj c cz sto zaledwie kilku procent. Łatwo te dało si zauwa y , e im bardziej zło ony organizm, tym mniejsza cz jego genomu koduje białka. W wietle najnowszych bada transkryptom komórkowy jawi si jako niezwykle bogaty zbiór cz steczek o rozmaitej wielko ci, strukturze, stabilno ci i funkcji.

I.1. Klasyfikacja RNA

Według ogólnie przyj tych kryteriów transkryptom komórkowy mo na podzieli na: RNA koduj ce białka i RNA niekoduj ce białek (Rys. I.1).

Bardziej homogenn , a przez to łatwiejsz do zdefiniowania grup stanowi cz steczki koduj ce białka, czyli RNA informacyjne (mRNA). Grup znacznie szersz i bardziej zróżnicowan pod wzgl dem funkcjonalnym tworz natomiast RNA, które nie stanowi matrycy do syntezy białek (ncRNA; ang. *noncoding RNA*). Im te w du ej mierze po wi cona została dalsza cz pracy.



Rysunek I.1. Ogólna klasyfikacja komórkowych RNA.

I.1.1. Kodujące RNA

Kodujące RNA obejmują tylko jedną klasę cząsteczek tj. mRNA, które służą jako matryca do syntezy białek. mRNA rzadko stanowi więcej niż 4-5% całkowitego RNA komórkowego. U eukariontów syntetyzowane są jako transkrypty pierwotne, a następnie ulegają obróbce posttranskrypcyjnej, podczas której dodawana jest czapeczka na końcu 5', ogon poli-A na końcu 3' oraz wycinane są introny. Dojrzała cząsteczka mRNA posiada zatem zmodyfikowane końce, a poza centralnie usytuowaną sekwencją kodującą zawiera również regiony nie ulegające translacji (3'- i 5'-UTR; ang. *untranslated region*).

Kodujące RNA stanowi frakcję transkryptomu, której kompozycja ulega ciągłym modyfikacjom m. in. poprzez zmiany wzoru transkrypcji. Dodatkowo cząsteczki mRNA są bardzo niestabilne. Zwykle czas ich półtrwania wynosi zaledwie kilka minut lub godzin (Brown, 2009). Trwałość i dostępną wielu z nich kontrolowana jest między innymi za pomocą małych niekodujących RNA, np. miRNA.

I.1.2. Niekoduj ce RNA

Pomimo, iż cz stezki kwasu rybonukleinowego, które nie stanowią matrycy do biosyntezy białka, zwykle się nazywa niekodującymi, nie oznacza to, iż nie niosą one żadnej informacji. Szacuje się, że około 98% RNA syntetyzowanego w ludzkich komórkach, stanowią sekwencje niekodujące: introny genów, sekwencje niepodlegające translacji (3' i 5' UTR), rRNA, tRNA, snRNA i snoRNA oraz inne (Mattick, 2001). Ostatnie badania sugerują również, że duża część sekwencji genomowych organizmów wyszczególniana jest na ncRNA, które poddawane są enzymatycznej obróbce, prowadzącej do powstania regulatorowych lub katalitycznych RNA. Znalezione wiele przykładów wskazujących, że rola cz stezek RNA, które nie kodują białek nie ogranicza się wyłącznie do udziału w procesie biosyntezy białka. Co więcej, okazało się, że mogą uczestniczyć w regulacji praktycznie wszystkich etapów ekspresji informacji genetycznej.

Niekodujące RNA podzielić można na dwie podstawowe podgrupy: konstytutywne RNA (ang. *housekeeping RNA*) oraz RNA o funkcjach regulatorowych zaliczane do ryboregulatorów (Szymański, Barciszewski, 2006).

I.1.2.1. Konstytutywne RNA

Konstytutywne RNA są niezbędne dla funkcjonowania komórki, a ich geny ulegają zazwyczaj stałej ekspresji. W skład tej grupy wchodzi RNA zaangażowane w następujące procesy: (i) translacji - transferowe RNA (tRNA) i rybosomalne (rRNA), (ii) dojrzewania i modyfikacji pierwotnych transkryptów - małe jądrowe RNA (snRNA), małe jądrowe RNA (snoRNA), RNA RNazy P, RNA redagujące (gRNA), (iii) replikacji DNA - matryce do syntezy telomerów (RNA telomerazy) oraz (iv) kontroli jakości translacji - transferowo-informacyjne RNA (tmRNA). Ze względu na kluczowe role w metabolizmie komórkowym, konstytutywne RNA, przede wszystkim rRNA i tRNA, są ewolucyjnie bardzo konserwatywne i obecne u wszystkich organizmów. U eukariontów ich transkrypcja zachodzi przy udziale polimerazy RNA I i III (Szymański, Barciszewski, 2006; Brown, 2009).

Konstytutywne RNA uczestniczą w procesach biosyntezy białka (tRNA i rRNA) stanowią dominującą część transkryptomu. Przyjmuje się, że 80% całkowitego komórkowego RNA stanowi rRNA, natomiast 12-15% przypada na tRNA. Obie te klasy cz stezek wyróżniają się dużą liczbą zmodyfikowanych nukleotydów. Modyfikacje te

polegają zazwyczaj na doł czeniu różnych grup funkcyjnych i dokonywane są w procesie obróbki posttranskrypcyjnej. Ze względu, iż są to powszechnie znane klasy RNA, w dalszej części przedstawiona zostanie jedynie krótka charakterystyka każdej z nich.

Człeczki rRNA są składnikami rybosomów – rybonukleoproteinowych kompleksów, w obrębie których odbywa się biosynteza białka. Obecnie przeważa pogląd, że za katalityczną aktywność rybosomu odpowiedzialny jest głównie zawarty w nim rRNA, natomiast białka rybosomalne funkcjonują jako kofaktory zwiększające wydajność translacji. W komórce występuje kilka typów rRNA, trzy u prokariotów i cztery u eukariotów. U bakterii mała podjednostka rybosomu zawiera 16S rRNA, a duża 5S i 23S rRNA. Natomiast u eukariotów mała podjednostka rybosomu zawiera 18S rRNA, a duża 5S, 5.8S i 28S rRNA. Wyjątkiem są rybosomy chloroplastowe i mitochondrialne, które przypominają rybosomy bakteryjne. Człeczki rRNA w rybosomach przybierają złożone struktury drugorzędowe, tworząc konserwatywne obszary wyspecjalizowane w interakcjach z mRNA, aminoacylo-tRNA i czynnikami białkowymi biorącymi udział w translacji (Brown, 2009).

Transportujące RNA, to małe człeczki (~74-95 nt), które dostarczają do rybosomów aminokwasy w kolejności zdeterminowanej przez sekwencję nukleotydów mRNA. Wewnątrz człeczkowe oddziaływania pomiędzy nukleotydami pozwalają im przybierać specyficzną strukturę drugorzędową, przypominając kształtem liżkoniczyny. Składa się ona z następujących elementów: ramienia akceptorowego, powstałego z 3' i 5' końcowych części człeczki; ramienia i pętli D; ramienia antykodonowego z pętlą antykodonu oraz ramienia i pętli T C. Ramię akceptorowe stanowi miejsce enzymatycznego przyłączenia aminokwasów. W proces ten zaangażowane są swoiste syntetazy aminoacylo-tRNA. Bakterie zawierają około 35-40, a organizmy eukariotyczne do 50 różnych tRNA (Brown, 2009). Warto wspomnieć, iż kilka różnych człeczek tRNA może być specyficznych wobec tego samego aminokwasu (tRNA izoakceptorowe), co jest uwarunkowane degeneracją kodu genetycznego. Natomiast wykorzystanie tRNA izoakceptorowych podczas translacji zależy od występowania synonimicznych kodonów w genach kodujących białka.

W genomie rośliny modelowej, jak jest *Arabidopsis thaliana*, występuje od jednego do kilkudziesięciu genów kodujących tRNA o tym samym antykodonie. Poszczególne reszty aminokwasowe kodowane są za pomocą jednego, dwóch lub kilku kodonów synonimicznych (maksymalnie sześciu) (*Genomic tRNA Database*; Lowe&Eddy). Liczba genów kodujących cytoplazmatyczne tRNA izoakceptorowe oraz

dane dotyczące wykorzystania kodonów synonimicznych u *Arabidopsis thaliana* zamieszczono w rozdziale Wyniki w Tabelach V.4 i V.5.

I.1.2.2. Regulatorowe RNA

Niekodujące RNA pełniące funkcje regulatorowe stanowi niezwykle interesującą frakcję transkryptomu komórki. Człeczki te zidentyfikowano zarówno u prokariotów, jak i eukariotów. Wśród eukariotycznych ryboregulatorów pojawia się w komórkach w odpowiedzi na zmienne warunki środowiska lub sygnały indukujące procesy rozwojowe. Człeczki te to transkrypty komórkowo- lub tkankowo-specyficzne. Znaczna ich część transkrybowana jest przez polimerazę RNA II, posiada czapkę, tzw. kap na końcu 5' oraz sekwencję poliA na końcu 3', a ich pierwotne transkrypty mogą ulegać splicingowi (Szymański, Barciszewski, 2006). Wszystkie wymienione właściwości, za wyjątkiem braku otwartych ramek odczytu (bardzo w niektórych przypadkach, znikomej zdolności do kodowania białek), człeczki upodabniają regulatorowe RNA do mRNA. Należy również dodać, iż to człeczki mniej zachowawcze od konstytutywnych RNA, a ich funkcja, w wielu przypadkach, nie jest znana. Wiadomo jednak z całą pewnością, iż ryboregulatory odpowiadają za transkrypcyjną i posttranskrypcyjną regulację ekspresji genów, np. poprzez udział w epigenetycznej modyfikacji chromatyny, wpływ na stabilność i lokalizację mRNA, czy modulację aktywności białek.

Badania dotyczące regulatorowych RNA nabrały w ostatnich latach znacznego tempa, prowadząc do odkrycia wielu nowych klas ryboregulatorów. Zasadniczo, jako jedno z kryteriów klasyfikacji tych człeczek może posłużyć ich wielkość, która waha się od około 20 do 100 000 nt. Podzielono je zatem na duże i małe regulatorowe RNA (Rymarquis, 2008).

I.1.2.2.1. Duże regulatorowe RNA

Zarówno u zwierząt, jak i u roślin występuje grupa tzw. dużych regulatorowych RNA (lncRNA, ang. *long noncoding RNA*; lub mlncRNA, ang. *mRNA-like noncoding RNA*) o długości powyżej 40nt. Przedstawiciele mlncRNA charakteryzują się niekiedy znacznym podobieństwem do mRNA - kodują peptydy, a w pełni funkcjonalne człeczki powstają z prekursorów w wieloetapowym procesie dojrzewania. Jak dotąd nieznaną rolę mlncRNA o dużych ramach odczytu (Rymarquis, 2008). Zwierzęcy mlncRNA Xist posiada dwie otwarte ramki odczytu (ORF ang. *open reading frame*). Każda z nich umożliwia syntezę peptydu o wielkości ~400 reszt aminokwasowych (Wutz, 2007).

Wiele mlncRNA bierze udział w epigenetycznej regulacji ekspresji genów. Jedną z takich cząstek jest H19 zaangażowany w tzw. imprinting genomowy (naznaczenie płci rodzicielskim) oraz Xist biorący udział w inaktywacji jednego z chromosomów X u ssaków płci żeńskiej (Ponting, 2009). H19 mlncRNA ulega ekspresji z genu znajdującego się na chromosomie odziedziczonym po matce, podlega splicingowi oraz poliadenylacji, a następnie jest transportowany do cytoplazmy (Bartolomei, 1991). Niestety funkcja, jaką pełni w cytoplazmie, pozostaje nadal niewyjaśniona, choć wydaje się, że może on uczestniczyć w regulacji wzrostu. Poza tym, niedawno dowiedziono, że mlncRNA H19 jest rodzajem miR675 (Cai i Cullen, 2007). Natomiast Xist RNA, kluczowy dla inaktywacji chromosomu X, jest deponowany w jądrze komórkowym, gdzie oddziałując z chromatyną jednego z chromosomów X, tworzy tzw. kompartmenty lub domeny RNA. Poszczególne geny, które podczas inaktywacji są konsekwentnie włączane do domeny RNA Xist, tracą charakterystyczne dla euchromatyny modyfikacje histonów, jak acetylacje, zyskując modyfikacje właściwe dla sekwencji nieczynnych transkrypcyjnie (Chaumeil, 2006). Dodatkowym elementem procesu inaktywacji jest metylacja wysp CpG promotorów wielu genów, a także inkorporacja swoistego wariantu makrohistonu H2A (Wutz i Gribnau, 2007). Nieaktywny chromosom X lokalizowany jest następnie w pobliżu jąderka, w postaci tzw. chromatyny płciowej zwanej też ciałkiem Barra. Stan taki jest dziedziczony w trakcie podziałów mitotycznych (Wutz i Gribnau, 2007) i ma na celu wyrównanie poziomu akumulacji produktów genów położonych na chromosomach X w komórkach somatycznych osobników żeńskich i męskich.

Bardzo często geny dla mlncRNA znajdują się w bliskim sąsiedztwie loci kodujących białka, co może prowadzić do wspólnej regulacji inicjacji transkrypcji, np. poprzez zmiany struktury chromatyny (Ponting, 2009; Gribnau, 2000). Udowodniono, że postać transkrypcji zapoczątkowanej z promotora pierwszego z genów może wpływać hamująco lub stymulująco na tworzenie inicjatorowego kompleksu transkrypcyjnego w obrębie sekwencji promotora drugiego genu. Przykładem regulacji negatywnej może być represja transkrypcji drożdżowego genu *ser3* (ang. *serine 3 biosynthesis gene*), w sytuacji gdy gen mlncRNA znajduje się powyżej jego loci jest transkrybowany (Martens, 2004). Dzieje się tak ponieważ koniec 3' niekodującego RNA zachodzi na element regulatorowy promotora genu *ser3*. W efekcie czego dochodzi do kolizji elementów maszynarii transkrypcyjnej (Martens, 2004). Transkrypcja mlncRNA może również ułatwiać dostęp polimerazy RNA do sąsiedniego rejonu promotorowego (Hirota, 2008). Niedobór glukozy u drożdży prowadzi do aktywacji ekspresji genu *fbp1* (ang. *fructose-1,6-bisphosphatase 1*),

a także kilku mlncRNA, których geny umieszczone są powyżej. Transkrypcja niekodujących RNA i przesuwanie się elementów maszynerii transkrypcyjnej przez rejon promotorowy genu *fbp1* prowadzi do zmian w strukturze chromatyny umożliwiających złożenie transkrypcyjnego kompleksu inicjatorowego (Hirota, 2008).

mlncRNA mogą również pełni funkcję regulatorów poprzez kontrolę subkomórkowej lokalizacji czynników transkrypcyjnych. Jednym z nich jest mlncRNA NRON (ang. *ncRNA repressor of the nuclear factor of activated T*) wpływający na lokalizację czynnika transkrypcyjnego NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) prawdopodobnie poprzez oddziaływanie z białkami transportu jądrowego (Willingham, 2005). Z kolei mlncRNA 7SK wpływa negatywnie na elongację transkrypcji z udziałem polimerazy II RNA, poprzez redukcję aktywności kinazowej czynnika elongacji transkrypcji P-TEFb (ang. *Positive Transcription Elongation Factor b*) (Nguyen, 2001). W oddziaływaniu te zaangażowane jest także białko HEXIM1 (ang. *Hexamethylene bisacetamide inducible 1*). Co ciekawe, charakterystyczna struktura drugorzędowa typu spinki do włosów, jak przyjmuje 7SK RNA, jest zachowawcza ewolucyjnie w przypadku takich organizmów jak ssaki, miśczaki, czy pierścienice (Gruber, 2008). Jako inhibitor Pol II może funkcjonować również mysz mlncRNA B2, pochodzący z elementów rozproszonych sekwencji powtórzonych SINE (ang. *short interspersed nuclear elements*). Ekspresja tego RNA wzrasta znacząco w momencie zaistnienia warunków stresu, np. szoku cieplnego, co wywiera negatywny efekt na transkrypcję genów aktywny czy heksokinazy II (Allen, 2004).

Przykłady dużych regulatorowych RNA u roślin. Choć roślinne mlncRNA są znacznie mniej poznane niż zwierzęce, analizy bioinformatyczne umożliwiły identyfikację 40 potencjalnych mlncRNA u *Arabidopsis thaliana* (Rymarquis, 2008) oraz 503 niescharakteryzowanych wcześniej mlncRNA u *Medicago truncatula* (Wen, 2007). Funkcja wielu z nich pozostaje niewyjaśniona, wiadomo jednak, iż ekspresja niektórych zachodzi w sposób tkankowo specyficzny, jest uzależniona od poziomu fitohormonów, makroelementów lub rytmu dobowego (Hirsch, 2007; MacIntosh, 2001).

Jednym z przykładów dużych regulatorowych RNA u roślin jest produkt genu *TPDII/Mt4* (ang. *Phosphate Starvation-Induced Genes1 in Tomato/Medicago truncatula 4*). *TPDII/Mt4* to dobrze scharakteryzowana rodzina genów ulegających ekspresji podczas niedoboru fosforu u rzodkiewnika, ryżu, pomidora i lucerny (Rymarquis, 2008; Shin, 2006; Burleigh i Harrison, 1999). Fitohormony, takie jak cytokininy i kwas abscysynowy, wpływają negatywnie na ekspresję genu *TPDII/Mt4* (Shin, 2006). Innym kluczowym

elementem odpowiedzi na niedobór fosforu jest miRNA o nazwie miR399 (Bari, 2006). Działa ono w sposób analogiczny do innych miRNA, nakierowując kompleks efektorowy RISC do komplementarnej sekwencji w mRNA PHO2 (ang. *phosphate overaccumulator 2*). Poprzez cięcie i degradację mRNA PHO2, miR399 uczestniczy w obniżeniu ekspresji czynnika E2, zaangażowanego w przekaz sygnału o niedoborze fosforu (Bari, 2006). Okazało się, że mlncRNA z rodziny TPDI1/Mt4 posiadają zachowawczą sekwencję o długości 24nt, która wykazuje znaczną komplementarność do miR399. Wysłunięto więc przypuszczenie, że transkrypty TPDI1/Mt4 mogą konkurować z mRNA PHO2 o wiązanie miRNA (Franco-Zorrilla, 2007). Jednakże lokalna struktura dwuniciowa tworzona przez miR399 i konserwatywny rejon mlncRNA TPDI1/Mt4 posiada wybrzuszenia w miejscu kluczowym dla działania transkryptu - pomiędzy 10 a 11 nukleotydem licząc od końca 5' miRNA. Taka sytuacja uniemożliwia przecięcie mlncRNA TPDI1/Mt4 a tym samym obniża poziom wolnego miR399 i ogranicza jego negatywny wpływ na ekspresję czynnika E2. Hipoteza zakładająca, że transkrypty TPDI1/Mt4 mogą funkcjonować jako swoiste antagomiRy znajduje potwierdzenie w danych eksperymentalnych. Wykazano bowiem, że nadekspresja mlncRNA IPS1 (ang. *Induced by Phosphate Starvation 1*), homologa TPDI1/Mt4 u *Arabidopsis thaliana*, znacznie podnosi poziom mRNA PHO2 (Franco-Zorrilla, 2007).

Duże regulatorowe RNA mogą być również zaangażowane w procesy nodulacji. Rodzina genów Enod40 (ang. *Early nodulin 40*) wzbudziła zainteresowanie naukowców m. in. ze względu na podwójną rolę jaką pełnią mogą ich transkrypty. Z jednej strony stanowią one matryce do syntezy krótkich peptydów, z drugiej funkcjonują jako mlncRNA. Geny Enod40 zawierają krótko otwarte ramki odczytu kodujące peptydy o długości od 10 do 25 reszt aminokwasowych oraz sekwencje sześciu odwróconych powtórzeń (IR; ang. *Inverted Repeats*) (Girard, 2003). Ulegają one ekspresji w całej roślinie, a w szczególności w różnicujących się komórkach brodawek korzeniowych na etapie primordium (Yang, 1993; Crespi, 1994) oraz w systemie waskularnym, gdzie poziom ich ekspresji skorelowany jest z pojawieniem się korzeni bocznych oraz zawiązków liści (Varkonyi-Gasic, 2002). Wykazano, że mlncRNA Enod40 wiąże się do ulegającego konstytutywnej ekspresji białka RBP1 (ang. *RNA-binding protein-1*) (Campalans, 2004). Rola tego białka nie jest znana, chociaż wydaje się, że może ono być zaangażowane w przekaz sygnału zależny od etylenu (Ponting, 2009). Pod nieobecność mlncRNA, białko MtRBP1 występuje na terenie jedra komórkowego, natomiast po związaniu transkryptu Enod40 pojawiają się w ziarnistościach cytoplazmy (Campalans,

2004). Taka zmiana lokalizacji może sugerować, że młncRNA Enod40 pełni funkcję przełącznika molekularnego.

Jak dotychczas znane są trzy młncRNA, których ekspresja u roślin zależy od płci. Są to: CSM10, Zm401 (ang. *Zea mays 401*) oraz CCLS96.1 spotykane odpowiednio u ogórka (*Cucumis sativus*), kukurydzy (*Zea mays*) i lepnicy (*Silene latifolia*) (Cho, 2005; Dai, 2007; Sugiyama, 2003). Transkrypt CSM10 należy do rodziny młncRNA o nazwie CSM10-GUT15 (Cho, 2005), charakteryzującej się obecnością zachowawczej sekwencji o długości ~180nt. W obrębie tej sekwencji występują dwie lub kilka struktur typu spinka do włosów. Gen CSM10-GUT15 ulega silnej ekspresji w wierzchołkach wzrostu oraz w siewkach ogórka hodowanych w warunkach krótkiego dnia w stadium jednego i czterech liści (Teramoto; 1996). Specyficzna synteza młncRNA CSM10 wydaje się być powiązana z kształtowaniem się organów generatywnych, ponieważ warunki krótkiego dnia indukują rozwój kwiatów męskich, natomiast warunki dnia długiego stymulują zawiązywanie się kwiatów żeńskich (Ponting, 2009). Gen kodujący Zm401, ulega ekspresji w trakcie rozwoju pyłku u kukurydzy (Dai, 2004). Homologi młncRNA Zm401 znaleziono również u ryżu, zboża i ułownicy ber (Dai, 2007). Nadekspresja tego RNA u kukurydzy prowadzi do redukcji przeważnie ilości i liczby pyłku, poprzez asynchronizację jego rozwoju i opóźnienie rozkładu tapetum, tkanki odwróconego woreczka pyłkowego (Dai, 2007). Natomiast wyciszenie homologa Zm401 ułownicy redukuje przeważnie pyłku prowadząc do przedwczesnego rozkładu tapetum i rodkowej powłoki woreczka pyłkowego. Obserwacje te dostarczają wielu dowodów, na udział młncRNA z rodziny Zm401 w rozwoju pyłku oraz deponowaniu i uwalnianiu składników odwróconych tapetum, jednak poznanie mechanizmu molekularnego tych procesów wymaga dodatkowych analiz (Ponting, 2009). Gen młncRNA CCLS96.1, izolowany z pylników lepnicy należy do rodziny, która koduje dziesięć różnych transkryptów o niepoznanej funkcji (Sugiyama, 2003). Najdłuższy z nich posiada otwartą ramkę odczytu, która mogłaby stanowić matrycę do syntezy peptydu o wielkości 99 reszt aminokwasowych. Gen CCLS96.1 ulega ekspresji w liściach i kwiatach, jednak jego akumulacja jest trzykrotnie większa w przypadku kwiatów męskich oraz o miokrotnie większa w liściach osobników żeńskich (Sugiyama, 2003).

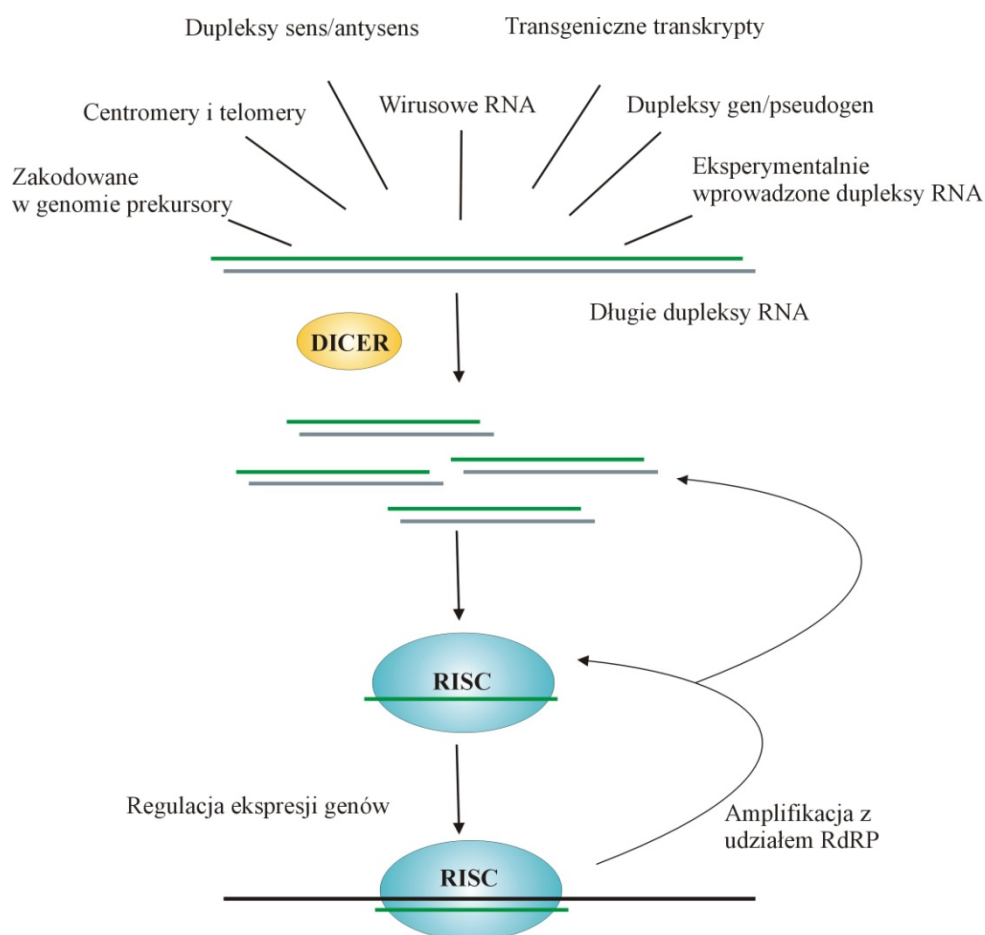
1.1.2.2.2. Małe regulatorowe RNA

W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszą się małe niekodujące RNA. Pomimo, że długość tych cząsteczek najczęściej nie przekracza 30

nukleotydów (Carthew, 2009), odgrywają one niezwykle istotną rolę w regulacji rozmaitych procesów komórkowych u zwierząt, roślin, grzybów czy pierwotniaków (Ramachandran i Chen, 2008b). Uczestniczą one w transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym wyciszaniu genów i w ten sposób kontrolują rozwój i wzrost organizmu oraz odpowiedź na stresy rodowiskowe (Phillips, 2007), utrzymują prawidłową strukturę chromatyny (Zheng, 2007), zapewniają obronę przeciw wirusom (Mlotshwa, 2009) i przeciwbakteryjną (Katiyar-Agarwal, 2007). W większości z nich ulega czasowo-specyficznej ekspresji. Zazwyczaj są syntetyzowane swoiście w danej tkance lub organie, niektóre, jak np. miRNA, wykazują zachowawczo ewolucyjną u organizmów znacznie oddalonych filogenetycznie (Bartel, 2004; Zhang, 2006). Małe niekodujące RNA mogą powstawać ze swoistych prekursorów zakodowanych w genomie, ich źródłem może być obcy materiał genetyczny (np. wirusowy lub eksperymentalnie wprowadzony RNA). Jeszcze inne powstają z długich dwuniciowych RNA powstałych w wyniku transkrypcji sekwencji powtórzonych czy pseudogenów lub w rezultacie hybrydyzacji transkryptów antysensowych (Rys. I.2).

Zgodnie z dotychczasową wiedzą na temat pochodzenia i sposobu działania krótkich regulatorowych RNA dokonano ich podziału na następujące klasy: miRNA (ang. *microRNA*), siRNA (ang. *small interfering RNA*), nat-siRNA (ang. *natural-antisense small interfering RNA*), tasiRNA (ang. *trans-acting small interfering RNA*), rasiRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*) oraz piwiRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*).

Ogólny schemat biogenezy krótkich regulatorowych RNA jest podobny dla większości tego typu cząsteczek i polega na trawieniu dwuniciowych prekursorów przez specyficzne rybonukleazy. Zwykle prowadzi ono do powstania 21-28-nukleotydowych dupleksów. Posiadają one dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' i resztę fosforanową na końcu 5'. W kolejnym etapie krótkie dupleksy RNA włączane są do kompleksów białkowych. Jedna z nici jest następnie usuwana i degradowana a druga funkcjonuje jako sonda umożliwiająca selektywne rozpoznanie docelowej cząsteczki DNA lub RNA (Rys. I.2).



Rysunek I.2. źródła małych regulatorowych RNA.

Jednym z białek zaangażowanych w biogenez małych regulatorowych RNA jest nale ca do klasy III rybonukleaza Dicer (Jinek i Douđa, 2009). Dicer jest białkiem monomerycznym i posiada: dwie tandemowo uło one domeny o aktywno ci RNazy, domen dsRDB (ang. *Double-stranded RNA-binding domain*) zlokalizowan na ko cu karboksylowym i wi c dupleksy RNA, N-ko cow domen DEXD/H-box, niewielk domen DUF283 (ang. *Domain of unknown function 283*) o niepoznanej funkcji oraz domen PAZ (ang. *Piwi Argonaute Zwillle domain*) odpowiedzialn za wi zanie niesparowanych nukleotydów ko ca 3' dsRNA (Jinek i Douđa, 2009). Przestrzenna organizacja poszczególnych motywów w białku Dicer, powoduje, i przypomina ono swym kształtem młot, b d siekier , z domenami katalitycznymi formuj cymi ostrze oraz domen PAZ tworz c podstaw trzonu. (Macrae, 2006; Jinek i Douđa, 2009). Nie ma pewno ci, co do tego, w jaki sposób Dicer rozpoznaje cz steczk prekursora oraz jakie mechanizmy odpowiadaj za precyzyjne wyznaczenie miejsc ci cia. Wydaje si jednak, e istotn rol odgrywa tutaj struktura drugorz dowa RNA. Genom *Arabidopsis thaliana*

koduje cztery homologii zwierzęcego białka Dicer, z których każdy uczestniczy w biogenezie małych regulatorowych RNA o swoistej długości i funkcji (Chapman i Carrington, 2007). Rybonukleaza DCL-1 (ang. *Dicer-Like Protein 1*) uczestniczy w szlaku syntezy miRNA. DCL-2 uczestniczy w biogenezie ta-siRNA oraz siRNA indukowanych infekcją wirusów. DCL-3 odpowiada za produkcję 24-nukleotydowych siRNA odpowiedzialnych za metylację chromatyny. DCL-4 generuje zarówno 21-nt siRNA pochodzące z endo- lub egzogennych sekwencji powtórzonych, jak i drugorzędowe siRNA zaangażowane w przekaz sygnału wyciszania (Chapman i Carrington, 2007).

Biogeneza i funkcje miRNA

Olbrzymie zainteresowanie, jakim cieszą się regulatorowe RNA, doprowadziło do zidentyfikowania kilkuset różnych miRNA u zwierząt i roślin. Oczekuje się, że liczba genów kodujących miRNA w poszczególnych gatunkach wynosi od 500 do 1000, co statystycznie odpowiada ~2-3% puli genów kodujących białka (Kim i Nam, 2006).

Geny kodujące miRNA u zwierząt często połączone są w grupy wspólnie ulegające transkrypcji przy udziale polimerazy RNA II. Tworzą zatem policistronowe prekursorzy. Natomiast geny miRNA roślinnych rzadko tworzą zgrupowania czy zespoły genowe (Bartel, 2004). Prekursorzy miRNA (pri-miRNA) transkrybowane są w większości jako odrębne jednostki transkrypcyjne, nie związane z genami kodującymi białka, choć u zwierząt możliwe jest generowanie miRNA z intronów. Niektóre miRNA kodowane są w kilku różnych loci. Loci te, będąc matrycami dla prekursorów, z których uwalniane są identyczne, bądź prawie identyczne miRNA zostały pogrupowane w tzw. rodziny genów. U roślin rodziny genów miRNA są zwykle liczniejsze i mniej zróżnicowane od zwierzęcych (Bartel, 2004; Zhang, 2006).

Zwierzęce pri-miRNA to najczęściej ~80 nt cząsteczki, posiadające czapkę na końcu 5' i ogon poliA na końcu 3'. Długość prekursorów roślinnych jest natomiast bardzo zróżnicowana i może sięgać do ~300 nt. W nieco odmienny sposób zachodzi również dojrzewanie zwierzęcych i roślinnych miRNA. W przypadku zwierząt pierwszym krokiem dojrzewania prekursora dokonuje enzym Drosha zlokalizowany w jądrze komórkowym (Lee, 2003). Produkt działania RNazy Drosha, nazywany pre-miRNA, jest następnie transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy przy udziale białka receptorowego Exportyny-5 (Lund; 2004). Swoistym sygnałem kierującym pre-miRNA na drogę transportu jest, rozpoznawany przez exportynę -5, helikalny motyw prekursora wielkości >14 nt oraz niesparowane nukleotydy na końcu 3' (Zeng i Cullen, 2004). W cytoplazmie zachodzi

kolejny etap biogenezy miRNA, czyli wycięcie krótkiego dupleksu z pre-miRNA. Uczestniczy w nim rybonukleaza Dicer. Zwykle towarzyszy jej kofaktor np. białko R3D1 u *Drosophila melanogaster* lub TRBP (ang. *TAR RNA-binding protein*) u człowieka (Kim i Nam, 2006).

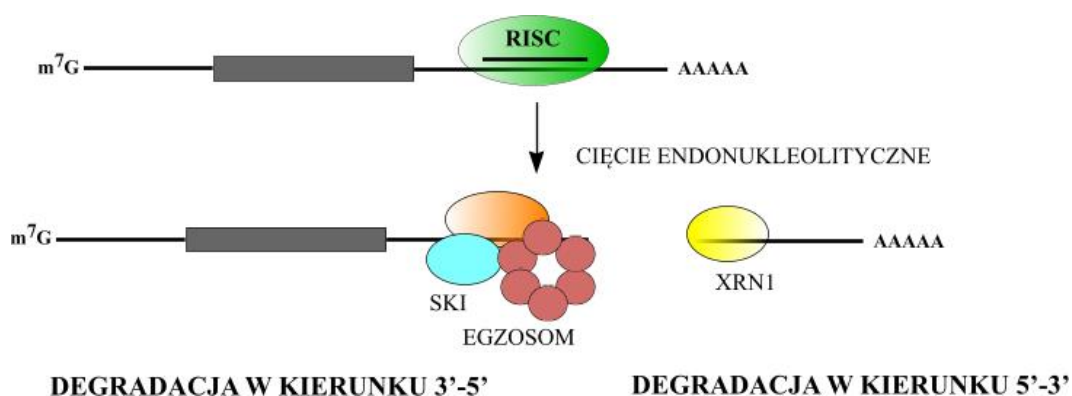
U roślin zarówno pierwsze, jak i drugie cięcie prekursora miRNA zachodzi przy udziale rybonukleazy DCL-1, będącej homologiem zwierzęcego białka Dicer. Jako, że DCL-1 występuje w całym drzewie komórkowym, oba etapy dojrzewania roślinnych mikroRNA ograniczają się do tego miejsca (Bartel, 2004). Rozpoznanie prekursora oraz cięcie prowadzące do powstania miRNA wymagają udziału dodatkowych białek: białka wiążącego dsRNA o nazwie HYL1 (ang. *Hyponastic Leaves*) oraz białka SE (ang. *Serrate*) (Voinnet, 2009). Miejsce, w którym białka DCL-1, HYL1 i SE oddziałują z prekursorem to tzw. jądrowe ciało D, inaczej ciało SmD3/SmB (Fang i Spector, 2007).

Kolejnym etapem dojrzewania roślinnych miRNA jest ich metylacja. Proces ten katalizuje metylaza zależna od S-adenozylometioniny, HEN1 (ang. *Hua Enhancer 1*) (Voinnet, 2009). HEN1 jest odpowiedzialna za modyfikację szerokiej puli małych regulatorowych RNA. Dodanie grupy metylowej w pozycji O^{2'} nukleotydu występującego na końcu 3' obu czeczek tworzących dupleks, zapobiega przyłnczaniu reszt urydyny i tym samym chroni miRNA przed degradacją (Jones-Rhoades i Bartel, 2006). W takiej postaci dupleksy miRNA/miRNA* transportowane są z jądra komórkowego do cytoplazmy. W procesie tym uczestniczy białko Hasty, roślinny ortolog Exportyny-5 (Park, 2005).

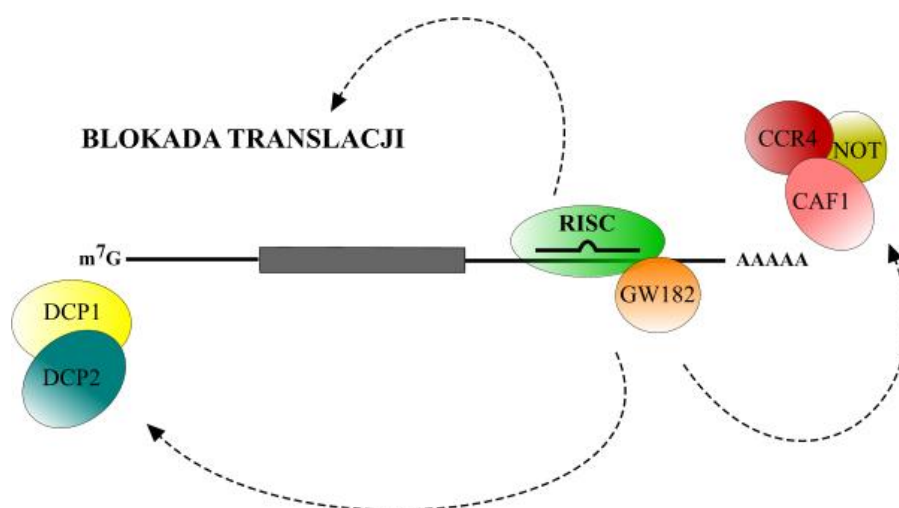
W cytoplazmie następuje asocjacja miRNA z białkiem z rodziny Ago (ang. *Argonaute*), w skutek czego powstaje minimalny rdzeń tzw. kompleksu efektorowego RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) (Jinek i Doudna, 2009). Powstanie RISC wymaga rozplecenia dupleksu miRNA:miRNA* i odrzucenia tzw. niepaserskiej (miRNA*) (Jones-Rhoades i Bartel, 2006). Jako funkcjonalne miRNA wybierana jest zwykle ta niepaserska, której koniec 5' jest termodynamicznie mniej stabilny (Jinek i Doudna, 2009). miRNA w kompleksie RISC funkcjonuje następnie jako specyficzna sonda umożliwiająca rozpoznanie docelowego mRNA. Pełna lub prawie pełna komplementarność pomiędzy czeczką miRNA a mRNA prowadzi do przecięcia docelowego transkryptu. Taka sytuacja przeważa u organizmów roślinnych, gdzie przecięcie ulega wiązaniu pomiędzy nukleotydami znajdującymi się w opozycji do grupy fosforanowej pomiędzy 10 i 11 nukleotydem miRNA, licząc od jego końca 5' (Rys. 1.3) (Jones-Rhoades i Bartel, 2006). W przypadku przecięcia docelowego mRNA przez RISC

oba nowopowstałe fragmenty kierowane są na drogę degradacji. Fragment 5' mRNA trawiony jest najprawdopodobniej przez kompleks białkowy zwany egzozomem. Natomiast fragment 3' mRNA usuwany jest za pomocą egzonukleazy XRN1 (Orban, 2005). *Arabidopsis thaliana* posiada kilka paralogów XRN, lecz prawdopodobnie tylko jeden z nich, XRN4, odpowiedzialny jest za rozkład mRNA w kierunku od końca 5' do 3' (Souret, 2004).

U zwierząt natomiast, miRNA jest z reguły tylko częściowo komplementarny do docelowego transkryptu. W takiej sytuacji przyłączenie kompleksu RISC wywołuje represję mRNA poprzez inhibicję translacji lub indukcję deadenylacji prowadząc do degradacji cząsteczki docelowej (Rys. I.4) (Wakiyama, 2007). Mechanizm tego procesu nie został jak dotąd w pełni poznany. Wiadomo jednak, że RISC wraz z mRNA poddanym represji transportowany jest do ziarnistości cytoplazmy zwanych ciałkami P, w których transkrypt jest zatrzymywany lub degradowany (Eulalio, 2007).



Rysunek I.3. Mechanizm działania miRNA – pełna komplementarność pomiędzy „sondą” (miRNA) występującą w kompleksie RISC a cząsteczką docelową prowadzi do przecięcia wiązania internukleotydowego w mRNA i degradacji powstałych fragmentów z udziałem kompleksu Egzozomu i Ski oraz egzonukleazy XRN1.



Rysunek I.4. Mechanizm działania miRNA – niepełna komplementarność pomiędzy „sondą” (miRNA) obecną w kompleksie RISC a czynnikiem docelowym prowadzi do zatrzymania translacji mRNA, czego skutkiem może być degradacja mRNA wymuszona skracaniem ogona poli(A) i usunięciem struktury kap za pomocą wyspecjalizowanych kompleksów enzymatycznych CAF1-CCR4-NOT i DCP1/DCP2.

Ciałka P (ang. *Processing Bodies*). Struktury zwane ciałkami P lub ciałkami rozkładu mRNA to cytoplazmatyczne zagęszczenia czynników zaangażowanych w degradację RNA, m. in. głównej cytoplazmatycznej egzonukleazy organizmów eukariotycznych, XRN1 (ang. *5'-3' exoribonuclease 1*) oraz enzymu dekapującego DCP (ang. *Decapping Protein*) i jego kofaktorów (van Dijk, 2002). W ostatnich latach lista komponentów ciałek P została wydłużona o: (i) białka markerowe, niezbędne do utrzymania integralności tych struktur, takie jak RAP55 (ang. *RNA-Associated Protein 55*), Ge-1 (ang. *glycine(G) protein*) i GW182 (*tryptophan(W) Protein 182*), (ii) białka nadzorujące RNA, (iii) białka maszyneryi wyciszania genów i represji translacji, a także (iv) czynnik inicjacji translacji eIF4E (ang. *Eukaryotic translation initiation factor 4E*) i transportujący go kofaktor eIF4E-T (ang. *Eukaryotic translation initiation factor 4E – Transporter*) (Eulalio, 2007). Wikszość elementów ciałek P jest równie rozproszona w cytoplazmie komórki, mogą one swobodnie asocjować do komponentów tych struktur, jak i na powrót ulegać dysocjacji (Eulalio, 2007).

Struktury ciałek P są do łatwe w detekcji w przypadku organizmów wielokomórkowych. W komórkach ssaków ich rozmiar sięga 100-300 nm (Eystathiou, 2002), natomiast u drożdży wizualizacja ciałek P często wymaga ekspozycji na warunki stresowe (Teixeira, 2005). Inhibicja transkrypcji poprzez aktynomycynę bądź ekspozycja

komórki na rybonukleaz A powoduje rozproszenie ciałek P i ich zanik, co sugeruje, że formowanie się tych struktur w istocie zależy od mRNA (Cougot, 2004; Teixeira, 2005). Podobnie dysocjacja elementów ciałek P ma miejsce w sytuacji, gdy rozkład RNA zostanie zahamowany na wczesnym etapie np. poprzez dezaktywację deadenylazy (Sheth i Parker, 2003). Natomiast blokada degradacji mRNA na jednym z późniejszych etapów tego procesu, np. poprzez dezaktywację egzonukleazy XRN1, skutkuje wzrostem ilości i rozmiaru ciałek P, zawierających produkty po rednie degradacji RNA (Sheth i Parker, 2003; Cougot, 2004; Teixeira, 2005). Mechanizm inicjujący formowanie się ciałek P nie został jeszcze dobrze poznany. Najprawdopodobniej degradacja mRNA rozpoczyna się w cytoplazmie. Związanie cząsteczki docelowej z RISC indukuje rekrutację pozostałych czynników i powstawanie ciałek P, które stają się miejscem koncentracji produktów po rednich degradacji mRNA (Eulalio, 2007). W ten sposób proces trawienia mRNA zostaje przyspieszony, dodatkowo nie dochodzi do współzawodnictwa o czynniki maszynarii translacyjnej pomiędzy cząsteczkami pełnej długości a cząsteczkami zdegradowanymi. Komponenty ciałek P to w większości białka wielodomenowe mogące wiązać jednocześnie kilka cząsteczek mRNA. W rezultacie dochodzi do ich lokalnej koncentracji w obrębie swoistego białkowego „rusztowania”, będącego zaczątkiem ciała P. Asocjacja kolejnych czynników uczestniczących w degradacji prowadzi do wykształcenia się kompleksowej w pełni funkcjonalnej struktury (Eulalio, 2007).

Biogeneza i funkcje siRNA

siRNA stanowi podklasę małych regulatorowych RNA, powstających z długich dupleksów RNA. Dupleksy takie mogą tworzyć się podczas replikacji wirusowych RNA, w wyniku transkrypcji sekwencji odwrotnie powtórzonych, lub w rezultacie działania endogennych polimeraz RNA zależnych od RNA. Rybonukleaza Dicer (DCL u roślin) trawi prekursorzy siRNA na wiele krótkich dupleksów, które po przyłączeniu do białek kompleksu efektorowego i rozpleceniu funkcjonują jako negatywne regulatory ekspresji genów. Do najlepiej poznanych siRNA zalicza się: siRNA zależne od polimerazy RdR2 (ang. *RNA-dependent RNA Polymerase*), działające in trans siRNA (ta-siRNA, ang. *trans-acting siRNA*) oraz naturalne antysensowne siRNA (nat-siRNA) a także związane z powtórzeniami siRNA (rasiRNA, ang. *repeat associated siRNA*).

siRNA zależne od polimerazy RdR2 stanowi największą i najbardziej zróżnicowaną grupę siRNA występujących u *Arabidopsis thaliana* (Ramachandran i Chen,

2008b). Najczęściej to cząsteczki pochodzące z transpozonów, retroelementów, czy powtórzonych fragmentów genomu (Kasschau, 20007; Lu, 2005). Ich biogeneza wymaga udziału polimerazy RdR2, która rozpoznaje odpowiednie transkrypty i wykorzystuje je jako matryce do syntezy komplementarnej nici RNA. Cięcię długiego prekursora dsRNA z udziałem rybonukleazy DCL3 generuje dupleksy siRNA o wielkości 24 nt (Xie, 2004), przy czym w przypadku braku funkcjonalnej rybonukleazy DCL3 jej funkcje mogą przejąć pozostałe białka DCL. siRNA wiąże się następnie z białkiem Argonaute, Ago4 i prawdopodobnie również Ago6, aby w kompleksie efektorowym wpływać na hamowanie ekspresji genów z których same pochodzą. Mechanizm tzw. transkrypcyjnego wyciszania genów, w którym uczestniczą, polega na metylacji DNA lub reszt lizynowych białek histonu H3 w obrębie tych loci (Xie, 2004). Niedawno odkryto inne czynniki zaangażowane w biogenezę siRNA zależnych od polimerazy RdR2. Są nimi izoformy zależnej od DNA polimerazy RNA IV, PolIVa oraz PolIVb (Pikaard, 2008).

Biogeneza i funkcje ta-siRNA

ta-siRNA są grupą endogennych siRNA, które działają *in trans*, regulując ekspresję genów innych niż te, z których same pochodzą (Vaucheret, 2006). U *Arabidopsis* znane są cztery rodziny genów TAS, których transkrypty nie kodują białek, są natomiast celem działania miRNA. Transkrypty izoform z rodziny TAS1, TAS1a, TAS1b i TAS1c, oraz rodziny TAS2 zawierają regiony komplementarne do sekwencji miR173, natomiast transkrypty genów z rodzin TAS3 i TAS4, zawierają sekwencje docelowe odpowiednio dla miR390 i miR834 (Vazquez, 2004; Allen, 2005). W efekcie działania kompleksu efektorowego RISC, docelowa cząsteczka RNA TAS zostaje przecięta w ściśle określonym miejscu a oba powstałe fragmenty są dodatkowo stabilizowane przez białko SGS3 (ang. *Suppressor of Gene Silencing 3*) (Peragine, 2004). Następnie na matrycy powstałych produktów cięcia syntetyzowana jest komplementarna nić RNA (Peragine, 2004) w procesie katalizowanym przez polimerazę RNA zależną od RNA (RdR6). Powstały długi dsRNA, będący prekursorem ta-siRNA, podlega sekwencyjnemu cięciu. Zaangażowana w ten proces rybonukleaza DCL4, począwszy od końca zdefiniowanego podczas cięcia z udziałem miRNA, uwalnia krótkie 21 nt dupleksy (Allen, 2005). W biogenezie ta-siRNA wydaje się być zaangażowane również białko DRB4 (ang. *Double-stranded RNA Binding Protein 4*) wiążące dwuniciowe RNA i oddziałujące z białkami DCL4 oraz SDE5 (Adenot, 2006). ta-siRNA w kompleksie z białkami AGO1 lub AGO7 regulują ekspresję docelowych genów poprzez indukcję cięcia ich transkryptów. W ród

genów regulowanych za pomocą ta-siRNA znajduje się gen czynnika transkrypcyjnego odpowiedzi hormonalnej ARF3 (ang. *Auxin Response Factor*) (Adenot, 2006).

Biogeneza i funkcje nat-siRNA

Endogenne siRNA, o nazwie nat-siRNA, pochodzą z dupleksów tworzonych przez cząsteczki RNA syntetyzowane w przeciwnych kierunkach na matrycy jednego z dwóch cząsteczkowo komplementarnych loci (Hollick, 2008). Produkcja jednego z tych transkryptów zachodzi zwykle w sposób ciągły, natomiast synteza drugiego może być indukowana np. zmieniającymi się warunkami środowiska, infekcją lub przez czynniki regulujące procesy rozwojowe (Picaard, 2008). Dupleksy, jakimi tworzą wzajemnie komplementarne końce transkryptów, są wydłużane za pomocą polimerazy RdR6, a następnie cięte do krótkich dsRNA przy udziale DCL1 i DCL2. W biogenezie nat-siRNA zaangażowane jest także białko SGS3 oraz polimeraza Pol IVa (Hollick, 2008).

Jak ogromny jest potencjał nat-siRNA świadczy o tym fakt, iż transkrypty antysensowe stanowią znaczną część całkowitego transkryptomu komórki. Analizy bioinformatyczne genomów sugerują, że a 1126 jednostek transkrypcyjnych *Arabidopsis thaliana* może posiadać odpowiadające im transkrypty antysensowe (Henz, 2007). 9023 transkrypcyjnie aktywne rejony genomu ryżu mogą być źródłem matryc nat-siRNA (Li, 2007), natomiast u kukurydzy substrat do produkcji nat-siRNA stanowi w zależności od typu tkanki, od 5% do 11% całkowitego transkryptomu (Ma, 2006). Okazuje się, że cząsteczek antysensowych transkryptów może być matryc do syntezy peptydów o wielkości ~100 reszt aminokwasowych (Rymarquis, 2008). Jak dotychczas, jak mogą pełnić transkrypty antysensowe została określona jedynie w kilku przypadkach i sprowadza się do udziału w procesie wyciszania ekspresji genów z udziałem małych RNA. Najlepiej poznane nat-siRNA generowane są w odpowiedzi na stres osmotyczny. Indukuje on ekspresję transkryptu antysensowego o nazwie SRO5, który oddziałuje poprzez komplementarne pary zasad z fragmentem mRNA P5CDH (ang. *Pyrroline 5-Carboxylate Dehydrogenase*) (Borsani, 2005). Powstały w ten sposób dsRNA jest substratem dla enzymów zaangażowanych w wyciszanie genów. Generowane 24nt nat-siRNA kieruje degradacją transkryptu P5CDH. Cięcie mRNA P5CDH z udziałem kompleksu efektorowego RISC-nat-siRNA, aktywuje polimerazę RNA zależną od RNA. W efekcie syntetyzowany jest dsRNA będący substratem do produkcji drugorzędowych 21 nt siRNA i amplifikacji sygnału wyciszania. Obniżenie poziomu transkryptu P5CDH wzmacnia

syntez proliny, która podnosi poziom tolerancji komórki na stres osmotyczny (Borsani, 2005).

Dla ogromnej większości transkryptów antysensowych rola, jaką pełni w komórce pozostaje wciąż niewyjaśniona. Możliwe, i poza zaangażowaniem w procesy RNAi, naturalne siRNA mogą także brać udział w regulacji splicingu, czy poliadenylacji (Jen, 2005). Wnioski takie nasuwają przykłady par sens:antysens RNA u *Arabidopsis*, gdzie, jak się okazuje, pre-mRNA jest znacznie częściej poddawany alternatywnemu procesowi składania oraz posiada więcej potencjalnych sygnałów poliadenylacji niż transkrypty, dla których nie udokumentowano odpowiadających im naturalnych siRNA (Jen, 2005).

Biogeneza i funkcje rasiRNA i piRNA

W 2006 roku odkryto, że ludzkie i owadzie białka z rodziny PIWI wiążą grup małych RNA innych niż miRNA, czy typowe siRNA (Saito, 2006; Vagin, 2006). W ten sposób po raz pierwszy scharakteryzowano rasiRNA, których długość wynosi 24-27 nukleotydów. Udowodniono, że cząsteczki te są w szczególności akumulowane w jądrach we wczesnych etapach rozwoju *Drosophila melanogaster*, a ich źródło stanowi retrotranspozony oraz inne sekwencje powtórzone (Aravin, 2003). Inna grupa cząsteczek oddziałujących z białkami PIWI to piRNA. Ścisłe piRNA wyizolowane z jąder dorosłych myszy i szczurów pochodzą najczęściej z rejonów międzygenowych i podobnie jak rasiRNA są dłuższe od kanonicznych siRNA czy miRNA (Aravin, 2006). Geny dla większości piRNA usytuowane są blisko siebie tworząc wyraźne grupy. Osiągają one długość pomiędzy 1-100 kbp i kodują najczęściej od 10 do 4500 piRNA (Aravin, 2006). Taka sytuacja daje możliwość jednoczesnej regulacji ekspresji i syntezy tysięcy cząsteczek pochodzących z jednego locus. Pomimo, że mysie piRNA często posiadają resztę uracydyny na końcu 5', co jest charakterystyczne dla wszystkich cząsteczek powstających z dwuniciowych prekursorów przy udziale enzymów z klasy RNazy III, analizy bioinformatyczne nie wykazały, aby rejony flankujące piRNA tworzyły swoiste struktury drugorzędowe (O'Donnell i Boeke 2007). Zatem cząsteczki te muszą powstawać w sposób odmienny od miRNA. Niedawno zidentyfikowano piRNA również u *Drosophila melanogaster*. Okazało się, że cząsteczki te u bezkręgowców w większości kodowane są przez sekwencje heterochromatyny pericentromerów oraz telomerów i odpowiadają defektywnym elementom powtórzeniowym (Brennecke, 2007).

Jak dotychczas niewiele wiadomo o mechanizmach działania piRNA. Potencjalnie cząsteczki te mogą być zaangażowane w epigenetyczne modyfikowanie chromatyny w.

Wiele również wskazuje, że piRNA, podobnie jak inne regulatorowe RNA, indukują cięcie docelowych transkryptów. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że cięcie to inicjuje cykl amplifikacji sygnału wyciszania i generuje drugorzędowe piRNA w sposób analogiczny do syntezy drugorzędowych siRNA z udziałem polimerazy RNA zależnej od RNA (Brennecke, 2007; Gunawardane, 2007). Zgodnie z tym modelem piRNA powstają z pierwotnego transkryptu kodowanego przez sekwencję heterochromatyny w obrębie defektywnego transpozonu. W ten sposób powstałe cząsteczki, stanowią sekwencję antysensu do sekwencji RNA transpozonów ulegających ekspresji. piRNA jako niwiodące kompleksu rybonukleoproteinowego indukują cięcie w miejscu docelowym RNA aktywnego transpozonu, a z powstałych po przecięciu fragmentów powstają drugorzędowe cząsteczki sens-piRNA. U *Drosophila*, drugorzędowe piRNA wraz z białkiem Ago3, uczestniczą w kolejnych seriach cięcia pierwotnego transkryptu będącego prekursorem piRNA. Cykl utrzymuje się tak długo, jak długo nowopowstałe piRNA zdolne są do rozpoznawania sekwencji docelowej (Brennecke, 2007; Gunawardane, 2007). Chociaż wiele szczegółów proponowanego mechanizmu wymaga wyjaśnienia wydaje się, że stanowi on ważny punkt kontroli amplifikacji elementów mobilnych genomu w komórkach linii zarodkowych bezkręgowców. Nie poznano natomiast, jak funkcję pełni piRNA u ssaków. Postuluje się, że mogą być one zaangażowane w procesy spermatogenezy poprzez bezpośredni wpływ na mejozę (O'Donnell i Boeke 2007).

I.1.2.3. Niekodujące RNA jako biomarkery

W ciągu ostatnich lat zidentyfikowano bardzo wiele transkryptów, które nie kodują białek. Funkcja niektórych nie została dotychczas poznana, natomiast inne, jak miRNA czy siRNA, to transkrypcyjne i potranskrypcyjne regulatory ekspresji genów. Cząsteczki te charakteryzuje szereg unikalnych właściwości, jak np. swoista struktura prekursorów, czy wieloetapowy proces dojrzewania. Okazało się, że wiele niekodujących RNA ulega tkankowo- i organo-specyficznej ekspresji. Pewne cząsteczki pojawiają się w komórce tylko na określonym etapie rozwoju organizmu lub np. w odpowiedzi na sygnał indukowany czynnikami wzrostu, hormonami, czy stresem. Właściwości te powodują, że przynajmniej niektóre z niekodujących RNA są dziś wykorzystywane jako biomarkery. Jako przykład mogą posłużyć miRNA przydatne w diagnostyce wielu dysfunkcji i chorób, w tym starzenia, chorób serca, chorób neurologicznych, autoimmunologicznych i nowotworów (Mallardo, 2008; Wang, 2008).

Biomarkery to cz steczki, które dostarczają informacji o zmianach zachodzących w komórkach czy przebiegających w nich procesach biochemicznych. Istnieją pewne kryteria, które powinny spełniać cz steczki kandydujące do miana biomarkerów. Istotne znaczenie ma łatwość detekcji oraz wysoka czułość na zmiany, co umożliwia ich wykrycie już na początkowym etapie. Wymagana jest więc przede wszystkim odpowiednia procedura umożliwiająca wykrywanie danej cz steczki. Biomarker musi również charakteryzować się odpowiednią stabilnością, aby nie ulegał degradacji podczas przeprowadzania testów diagnostycznych. Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione czynniki, niekodujące RNA wydają się być dobrymi kandydatami na biomarkery. Ciągłe udoskonalana metodologia detekcji i ich analizy oraz fakt, że krótkie RNA są cz steczkami stosunkowo stabilnymi zarówno w żywych, jak i mroźnych tkankach, a nawet w preparatach parafinowych, jest bez wątpienia dużym walorem. Wysoce specyficzna ekspresja sprawia, że mogłyby one wykorzystywane jako swoiste biomarkery umożliwiające wykrywanie fizjologicznych jak i patologicznych zmian zachodzących w organizmie.

I.2. Degradacja RNA

Degradacja RNA jest jednym z głównych procesów determinujących poziom akumulacji różnego typu transkryptów. Odgrywa ona szczególnie istotną rolę ze względu na recykling nukleotydów. W przypadku mRNA, szybki rozkład cz steczki jest uzależniony od zapotrzebowania na specyficzne białko. Konstitutywne niekodujące RNA, do których zalicza się rRNA i tRNA są z reguły bardzo stabilne. Jednak w sytuacjach wyjatkowych, jak zwiększone zapotrzebowanie na fosfor, azot, węglen czy magnez one również mogłyby masowo degradowane (Deutscher, 2006 i 2003). Do degradacji dochodzi także w rezultacie procesu kontroli jakości RNA, podczas którego eliminowane są nieprawidłowo zsintetyzowane cz steczki RNA (Houseley 2006).

Ciśnięcie cz steczek mRNA może być również uniwersalnym elementem mechanizmu regulacji ekspresji genów. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku ukierunkowanej degradacji transkryptów na drodze interferencji RNA z udziałem innych cz steczek takich jak: siRNA, miRNA, nat-siRNA, tasiRNA.

Pomimo swej złożoności, mechanizmy degradacji RNA wydają się zachowywać podobieństwo we wszystkich organizmach żywych (Houseley i Tollervy, 2009). Znane są trzy klasy wewnątrzkomórkowych enzymów odpowiedzialnych za degradację RNA. Są to: endonukleazy prowadzące do przecięcia wiązania fosfodiesterowego wewnątrz cz steczki

RNA (Lebreton, 2008) oraz egzonukleazy 5' i egzonukleazy 3', hydrolizujące RNA począwszy odpowiednio od końca 5' lub 3' cząsteczki (Schaeffer, 2008; Kastenmayer i Green, 2000). W większości organizmów koduje wiele enzymów należących do klas RNaz, zdolnych do rozpoznawania i degradowania tych samych substratów. Często mutacja powodująca dysfunkcję jednej z RNaz jest częściowo rekompensowana udziałem innego enzymu z danej klasy, bez skutków ubocznych w postaci blokowania procesów rozkładu. Niektóre enzymy zaangażowane w degradację RNA uczestniczą również w innych ważnych procesach komórkowych, np. drożdżowa egzonukleaza 5', Rat1, oraz egzonukleaza 3' wchodzi w skład egzozomu, biorąc dodatkowo udział w procesach składania i dojrzewania końców cząsteczek RNA (Houseley i Tollervy, 2009). Charakterystyczna dla wielu rybonukleaz mnogość funkcji wskazuje na istotne znaczenie mechanizmów odpowiedzialnych za identyfikację RNA przeznaczonych do degradacji oraz na zaangażowanie w ten proces szeregu kofaktorów.

I.2.1. Kofaktory wspomagające degradację RNA

Czynniki, które współdziałają z RNazami na różnych etapach ich aktywności to przede wszystkim: enzymy z klasy helikaz i polimeraz, białka opiekuńcze oraz małe niekodujące RNA (Houseley i Tollervy, 2009).

I.2.1.1. Helikazy

Helikazy RNA zależne od ATP stanowią duży rodzaj białek zaangażowanych w procesy syntezy, dojrzewania i degradacji RNA. Enzymy te stanowią element kompleksu zarówno eukariotycznego egzozomu, jak i bakteryjnego degradosomu (Berstein, 2008; Chandran, 2007; Lebreton, 2008; Schaeffer, 2008; Schneider, 2009; Taghbalout i Rothfield, 2008). Dzięki energii dostarczanej w postaci ATP są one zdolne do przemieszczania się wzdłuż dupleksu dsRNA, rozplatania drugorzędowych struktur i translokacji zasocjowanych białek czy innych cząsteczek kwasów nukleinowych. Dodatkowo helikazy mogą funkcjonować, jako wyznaczniki cząsteczek przeznaczonych do degradacji. Chwilowy zastój helikazy powoduje bowiem mobilizację innych elementów egzozomu i w konsekwencji zapoczątkowuje rozkład naznaczonej cząsteczki (Cordin, 2006; Rajkowitsch, 2008).

I.2.1.2. Polimerazy

Stabilne struktury dwuniciowe, jakie mogą tworzyć kwasy nukleinowe, są przeszkodą dla egzonukleaz (Deutscher, 2006), dlatego korzystają one z aktywności polimeraz zdolnych do syntezy jednoniciowego fragmentu przy końcu czeczek RNA. Fragment ten w konsekwencji funkcjonuje jako miejsce zaczepu rybonukleazy. U drożdzy znany jest kompleks czynników poliadenylacji TRAMP (ang. *Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation complex*), w którego skład wchodzi: polimeraza poliA, białka wiążące RNA oraz helikaza RNA (Houseley 2006). Kompleks ten, jeszcze na terenie jądrowym komórki, naznacza defektywne czeczki RNA poprzez dodanie reszt adenozyliny do jej końca 3', co z kolei angażuje egzozom i prowadzi do sukcesywnej degradacji. Co ciekawe, niektóre egzonukleazy 3' mogą funkcjonować również jako polimerazy, czego przykładem jest bakteryjna fosforylaza polinukleotydowa PNPaza (Mohanty i Kushner, 2000; Portnoy, 2005). Enzym ten, poza właściwościami rybonukleazy, wykazuje zdolność czczenia do końca 3' czeczek RNA łańcucha nukleotydów, w którym przeważają reszty adenozyliny. W komórkach ludzkich zidentyfikowano homologi wszystkich elementów drożdżowego kompleksu TRAMP, nie wiadomo jednak, czy mechanizm ich działania przypomina model przedstawiony dla systemu drożdżowego (Slomovic, 2006; West, 2006). Wiadomo natomiast, że dodawanie tzw. ogona uracylowego, poliU, stymuluje degradację zmodyfikowanej w ten sposób czeczki (Mullen i Marzluff, 2008). Niewykluczone, że poliadenylacja, bądź poliurydylacja czeczek przeznaczonych do degradacji, podobnie, jak poprzedzająca degradację ubikwitynacja białek, jest procesem zachowawczym (Lorentzen i Conti, 2006).

I.2.1.3. Białka opiekuńcze

Ważnym kofaktorem procesów degradacji RNA są ewolucyjnie zachowawcze kompleksy białkowe Lsm1-7 i Lsm2-8 (ang. *Like-Spliceosome and Messenger RNA splicing protein*) u organizmów eukariotycznych oraz Hfg u bakterii (Beggs, 2005). Funkcjonują one jako białka opiekuńcze i uczestniczą w tworzeniu i stabilizacji kompleksów RNA:RNA, czy RNA:białko. Degradacja mRNA ludzkiego histonu wspomagana jest właśnie oddziaływaniem ogona poliU transkryptu z kompleksem Lsm1-7 (Mullen i Marzluff, 2008).

I.2.2. Rólne pomiędzy degradacji RNA z udziałem egzonukleaz 5' i 3'

Wiele RNA, jak mRNA, pri-miRNA, czy snRNA posiada zmodyfikowane koce. Zadaniem tych modyfikacji jest ochrona cz. steczki kwasu nukleinowego przed degradacją. U bakterii *Bacillus subtilis* degradacja mRNA z udziałem RNazyJ poprzedzona jest zawsze hydrolizą grupy trójfosforanowej na końcu 5' z udziałem hydrolazy pirofosforanu RppH (de la Sierra-Gallay, 2008; Mathy, 2007). Natomiast w przypadku organizmów eukariotycznych rozpoczęcie procesu degradacji od końca 5' wymaga usunięcia struktury czapeczki za pomocą, spokrewnionego z bakteryjną hydrolazą, enzymu dekapującego Dcp2 (Deshmukh, 2008; She, 2008). Proces ten jest nieodwracalny i umożliwia koniec cz. steczki RNA dla XRN1, głównej cytoplazmatycznej egzonukleazy eukariotycznej (Eulalio, 2007). W proces dekapowania zaangażowanych jest wiele ewolucyjnie konserwatywnych czynników. Należą do nich: Dcp1, EDC3 (ang. *Enhancer of mRNA Decapping 3 homolog*), Ge-1, Pat1 (ang. *Protein interacting with APP Tail 1*), kompleks białkowy LSm1-7, DexD/H-box oraz helikaza RNA Dhh1 (ang. *DExD/H-box Helicase*). W przypadku niektórych, funkcja nie została jeszcze poznana, wiadomo jednak, że wszystkie występują w obrębie ciała P. Przeciwnie, w ciałkach P, nie zaobserwowano żadnego elementu kompleksu zwanego egzozomem, z którym związana jest aktywność egzonukleazy 3' (Eulalio, 2007). Sugeruje to kompartmentyzację dróg degradacji RNA do różnych obszarów komórki. Egzozom jest obecny zarówno w jądrze komórkowym, gdzie niektóre z jego składników zaangażowane są w obróbkę końca 3' konstytutywnych RNA, jak i w cytoplazmie (Lebreton, 2008). Rdzeń egzozomu zbudowany jest z 9 podjednostek, z których 6 ułożonych jest na kształt pierścienia. Katalityczną podjednostką egzozomu drożdżowego jest natomiast białko Rrp44 (zwane również Dis3), należące do klasy RNazy II (Schaeffer, 2008). Aktywność egzozomu wymaga udostępnienia końca 3' cz. steczki wyznaczonej do degradacji m. in. poprzez usunięcie ogona poli(A) i jest regulowana przez kompleks białkowy SKI (Wilusz, 2004).

Poza enzymami degradującymi RNA w specyficzny sposób, organizmy posiadają również rozmaite niespecyficzne RNazy. Przykładem może być ssacza RNaza A, czy RNaza T1 pochodząca z grzybów. Są to białka zewnątrzkomórkowe, których produkty cytotoksyczne, inaczej niż produkty enzymów cytoplazmatycznych czy jądrowych, posiadają grupę monofosforanową na końcu 3' i grupę hydroksylową na końcu 5' cz. steczki. Ich funkcja jest ściśle powiązana z ochroną organizmu przed inwazją obcych cz. steczek do wnętrza komórek (Houseley i Tollervy, 2009).

I.2.3. Mechanizmy degradacji zależne od syntezy i dojrzewania cz. steczek RNA

Degradacja RNA jest nie tylko procesem rozkładu niepotrzebnych cz. steczek i stałego uzupełniania puli wolnych nukleotydów. Mechanizmy odpowiedzialne za cięcie kwasów nukleinowych mogą być ukierunkowane i odgrywać istotną rolę na wielu etapach biogenezy funkcjonalnych RNA. Wiskość cz. steczek RNA syntetyzowanych jest w postaci wikszych prekursorów, z których w procesie dojrzewania, wycinane są fragmenty niekodujące, np. introny. Wiele pierwotnych transkryptów wymaga dojrzewania jednego lub obu końców cz. steczki, co równie zaangażuje niektóre elementy maszynerii nukleolitycznej (Houseley i Tollervwy, 2009).

Bazując na danych literaturowych można wysnuć wniosek, że degradacja mRNA i konstytutywnych RNA (tRNA, rRNA) może przebiegać według podobnego schematu. Rozkład cz. steczki RNA wymaga zwykle cięcia inicjującego przeprowadzanego przez jeden z enzymów endonukleolitycznych, po których następuje egzonukleolityczne trawienie powstałych fragmentów RNA do pojedynczych nukleotydów (Deutscher, 2006 i 2003). Ponieważ jednak degradacja stanowi integralną część procesu syntezy i dojrzewania RNA, stąd zachodzi ona nieco inaczej w zależności od tego, która z polimeraz jest odpowiedzialna za syntezę danej cz. steczki.

I.2.3.1. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol I

Polimeraza RNA Pol I odpowiedzialna jest za syntezę policistronowego transkryptu pierwotnego, na który składają się trzy z czterech eukariotycznych cz. steczek rRNA. Dojrzałe rRNA generowane są z prekursora w rezultacie sekwencyjnych cięć zarówno endo- jak i egzonukleolitycznych, usuwających zewnętrzne (ETS; ang. *External Transcribed Spacer*) i wewnętrzne (ITS; ang. *Internal Transcribed Spacer*) нефункциональные фрагменты cz. steczki. Synteza rRNA jest ściśle skorelowana z procesem składania rybosomów. Ze względu na to, iż zapotrzebowanie na składniki maszynerii biosyntezy białka jest w komórce bardzo wysokie, stąd szybkość składania rybosomów u drożdży może sięgać nawet 2000 min^{-1} . Dlatego też degradacja elementów ETS i ITS uwolnionych z pre-rRNA stanowi trzon komórkowych procesów degradacji (Houseley i Tollervwy, 2009). W dojrzewaniu rRNA i składaniu rybosomów uczestniczy szereg białek, zwanych czynnikami syntezy rybosomu. Wiele z nich musi zostać uwolnionych na pewnym etapie dojrzewania pre-rybosomu, aby uzupełnić pulę dostępnych białek. W uwalnianiu niektórych czynników syntezy rybosomu uczestniczą helikazy RNA, GTPazy i

ATPazy (Henras, 2008), natomiast inne uwalniane są dzięki cioci i degradacji ETS i ITS, z którymi są zassocjowane. W ten sposób degradacja RNA, promując recykling czynników syntezy, zapobiega ich deficytowi w komórce. Wiadomo, że w szybkiej degradacji 5' ETS zaangażowany jest kompleks TRAMP i egzosom (Lebreton, 2008; Schneider, 2009).

Dojrzałe cytoplazmatyczne podjednostki rybosomów są bardzo stabilne, a ich degradacja zachodzi na bardzo niskim poziomie. Istnieją jednak dowody na to, iż rozkład translacyjnie nieaktywnych rybosomów zachodzi właśnie poprzez degradację RNA (LaRiviere, 2006). Mechanizm tego procesu nie został jeszcze dokładnie poznany, być może jest on spokrewniony z cioci mRNA w sytuacji wygaśnięcia translacji. Wpływ na indukcję cioci rRNA może wywierać wiele czynników stresowych (Mroczek i Kufel, 2008; Thompson, 2008). Z pewnością ma to związek z wymuszonym zatrzymaniem translacji, nie wiadomo natomiast, jaka jest funkcja produktów degradacji rRNA. Stwierdzono bowiem, że niektóre spośród nich mogą być w komórce akumulowane.

I.2.3.2. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol II

Produkty syntezy z udziałem polimerazy RNA Pol II stanowią bardzo zróżnicowaną grupę cząstek, wliczając pre-mRNA, a także prekursorów wielu konstytutywnych (snRNA i snoRNA), jak i regulatorowych (miRNA) RNA. Transkrypcja z udziałem tej polimerazy wiąże się z dołknięciem struktury czapeczki do końca 5' syntetyzowanego RNA, jako elementu chroniącego przed atakiem egzonukleaz 5' (Houseley i Tollervwy, 2009). Niepowodzenie na tym etapie dojrzewania RNA prowadzi do przerwania transkrypcji i degradacji nieprawidłowej cząstki z udziałem egzonukleazy Rat1 (West, 2008).

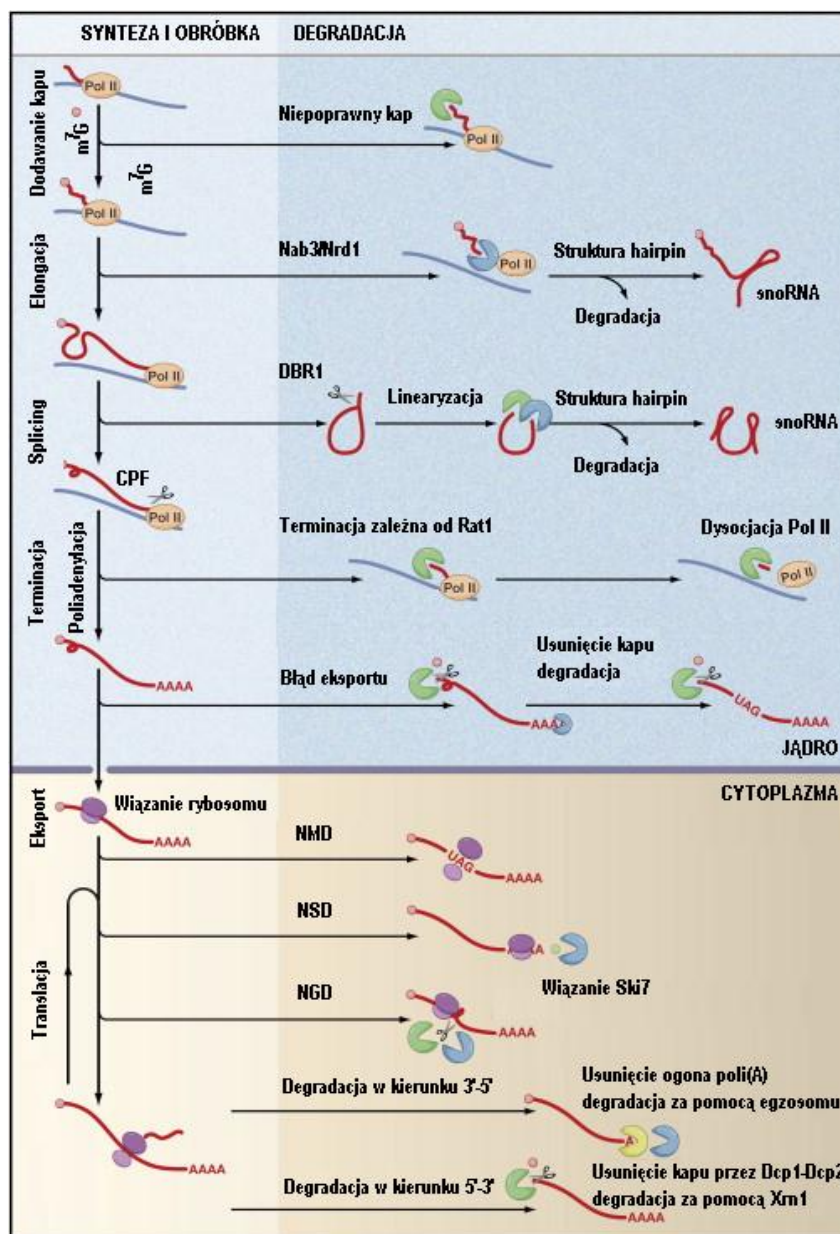
Transkrypty mRNA podlegają wieloetapowemu dojrzewaniu, modyfikacji końców i wycinaniu sekwencji intronowych. Degradacja usuniętych z pre-mRNA intronów wymaga dodatkowej aktywności enzymów wyspecjalizowanych w cioci wianiu 2'-5' fosodiestrowego (ang. *debranching*) (Chapman i Boeke, 1991). Odpowiadają one za linearyzację cyrkularnej postaci lasa, jak przyjmują uwalniane introny. Mutanty drożdżowe z defektywnym enzymem odpowiedzialnym za „*debranching*”, są niezdolne do degradacji intronów, co sugeruje również, iż w obrębie jądra nie występują endonukleazy (Houseley i Tollervwy, 2009). Introny po linearyzacji podlegają zwykle całkowitej degradacji, bądź też, w szczególnych przypadkach, stanowią źródło funkcjonalnych cząstek: snoRNA, czy miRNA pochodzenia intronowego (Ying SY, 2004).

mRNA, od innych produktów Pol II, odróżnia specyfika dojrzewania końca 3' czeczek. Polega ono na przecięciu łańcuch polinukleotydowego w ściśle wyznaczonym miejscu przy końcu 3', a następnie dołączeniu długiego „ogona” adenozyнового przez polimerazę poli(a) PAP/Pap1 (ang. *Poly(A) Polymerase*) (Colgan, 1997). Cięcie pre-mRNA w wyznaczonym miejscu, przy końcu 3', jest również swoistym sygnałem terminacji transkrypcji i zapobiega kontynuacji syntezy RNA na matrycy siednich genów. Odcinany fragment 3' powstającego transkryptu jest substratem dla egzozukleazy Rat1, która w efekcie tzw. mechanizmu „Torpedo” rozkłada RNA, a do momentu napotkania i uwolnienia polimerazy (West, 2008). Inaczej niż w przypadku poliadenylacji transkryptów przeznaczonych do degradacji (z udziałem kompleksu TRAMP), dodawanie reszt adenozy do mRNA wzmacnia ich stabilność. Dzieje się tak najprawdopodobniej w skutek natychmiastowej rekrutacji, jeszcze w trakcie syntezy, białek wiążących „ogon” poli(A) (Houseley i Tollervwy, 2009; Rougemaille, 2008).

W cytoplazmie, każda czeczek mRNA podlega sukcesywnemu skracaniu ogona poli(A), a do momentu krytycznego, w którym następuje zahamowanie biosyntezy białka i uwolnienie transkryptu z rybosomu (Schwede, 2008). Całkowite usunięcie sekwencji poli(A) ułatwia, rozkład czeczek w kierunku 3'-5' z udziałem egzozozomu (Parker, 2007). W następnym skracaniu ogona poli(A), mRNA może zostać skierowany do ciałek P, w których, od usunięcia czapeczki z końca 5', rozpoczyna się proces degradacji przez egzozukleazę 5', jak XRN1 (Franks i Lykke-Andersen, 2008; Shyu, 2008). Ostatnie doniesienia sugerują, że deadenylacja, czy degradacja mRNA rozpoczynają się od końca 5' czeczek, nie zawsze wymaga zaprzestania syntezy białka, lecz może zachodzić również, gdy mRNA zasocjowany jest na polisomach (Houseley i Tollervwy, 2009).

Po transporcie dojrzałego mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, a czesto również w jądrze komórkowym, następuje ocena poprawności splicingu w ramach „kontroli jakości RNA” (Doma i Parker, 2007). Kontrola pozwala na szybką degradację nieprawidłowych transkryptów, które potencjalnie mogłyby kodować zmienione białka.

Zależności pomiędzy syntezą i obróbką a degradacją transkryptów RNA Pol II przedstawiono na Rys. 1.5.



Rysunek I.5. Zależności między syntezą i obróbką a degradacją transkryptów RNA Pol II. Dodawanie kapu - niepoprawne dodanie struktury kap kieruje powstający transkrypt na drogę degradacji. Elongacja transkrypcji - kofaktory egzozomu Nrd1-Nab3 zaangażowane są w terminację transkrypcji genów snoRNA. Splicing - dojrzewanie prowadzi do uwolnienia intronów w formie lasa, ich degradacja poprzedzana jest linearyzacją czeczek za pomocą DBR1; (intryony mogą być również rodzajem snoRNA). Terminacja transkrypcji - zakończenie syntezy mRNA związane jest z cięciem transkryptu i poliadenylacją; odcinany fragment 3' transkryptu jest substratem dla egzozonukleazy Rat1. Eksport - błędny eksport kieruje RNA na drogę degradacji. Translacja - mRNA podlega kontroli jako cel NMD, NGD i NSD. Stopniowe skracanie ogona poli(A) prowadzi do degradacji w kierunku 3'-5' oraz usunięcia struktury kap i degradacji w kierunku 5'-3' (Houseley i Tollervy, 2009). Szczegółowy opis w tekście.

Kontrola jakości RNA powoduje, że tylko właściwie zsyntetyzowane, złożone i zmodyfikowane mRNA służą jako matryce do biosyntezy białek (Fasken i Corbett, 2005). W komórce rozpowszechniony jest system kontroli pozwalający na szybką identyfikację tzw. transkryptów nonsensownych, zawierających przedwczesne kodony terminacji translacji. Takie cząsteczki kierowane są na szlak degradacji NMD (ang. *nonsense mediated degradation*). Początkowym etapem tego procesu jest składanie kompleksu NMD, tworzonego przez nieprawidłowy RNA i czynniki białkowe: helikazy UPF1-3 oraz białka SMG1 i SMG5-7. U drożdży kompleks ten wymaga obecności zarówno enzymu dekapującego oraz egzonukleazy XRN1, jak i egzosomu. Natomiast u muszki owocówki degradacja nonsensownych transkryptów wymaga endonukleolitycznego cięcia w obrębie nieprawidłowego kodonu. Powstałe w ten sposób fragmenty RNA są następnie substratami dla egzonukleaz 5' i 3'. Nie wiadomo dokładnie, czy degradacja RNA w ramach NMD zachodzi w cytoplazmie, czy też kompleks białek NMD transportuje nonsensowny mRNA do ciałek P, w których ma miejsce ich degradacja. Dowodem na zaangażowanie struktur P w zależność od NMD degradacji mRNA jest obecność na ich terenie białek SMG7, SMG5 i UPF1. Jednakże u muszki owocówki i drożdży z defektywnym białkiem GW182, niezdolnych do wykształcenia struktur P, nie zaobserwowano zaburzeń degradacji na drodze NMD (Eulalio, 2007).

Komórki wykazują również zdolność eliminacji mRNA, które tworzą trwałe struktury w obrębie otwartych ramek odczytu. Transkrypty te zostają skierowane na szlak degradacji po wygaśnięciu biosyntezy białka, spowodowanym strukturalną zawadą przestrzenną, na jaką napotkał rybosom. Dzieje się to za sprawą systemu kontroli zwanego NGD (ang. *No-Go Decay*) (LaRiviere, 2006). Inny system kontroli, NSD (ang. *No-Stop Decay*) odpowiada natomiast za eliminację nieprawidłowych mRNA, które nie zawierają kodonu stop. W przypadku braku sygnału terminacji translacji, wygaśnięcie biosyntezy białka wiąże się z zatrzymaniem rybosomu w obrębie sekwencji łącucha poli(A). Jednym ze sposobów uwolnienia rybosomu jest związanie kompleksu białkowego SKI, który jednocześnie nieznacznie kieruje mRNA do degradacji (Frischmeyer, 2002).

Istnieją także mRNA, które mimo prawidłowej budowy, degradowane są znacznie szybciej od pozostałych. Stwierdzono, iż cząsteczki te zawierają elementy regulatorowe ARE (ang. *Adenosine Rich Elements*), bogate w reszty adenozyliny i uracylu (Eulalio, 2007). Regulatory te działają w układzie *cis* i zlokalizowane są najczęściej w rejonach nieulegających translacji na końcu 3' (3'UTR) mRNA. Cząsteczki o krótkim czasie półtrwania stanowią matryce do syntezy białek przez ciową występujących w komórce,

takich jak cytokiny, cykliny, czynniki wzrostu, protoonkogeny. Wykazano, że mRNA zawierające elementy ARE ulegają stosunkowo szybkiej degradacji w trakcie regulowanego procesu zwanego AMD (ang. *ARE mediated degradation*) (Barreau, 2005). Elementy ARE zdolne są do wiązania szeregu czynników zarówno stabilizujących, jak i destabilizujących transkrypt. Niektóre, jak czynnik TTP i BRF1, promują degradację mRNA, natomiast białko AUF1, w zależności od izoformy, może wpływać na transkrypt na oba sposoby (Barreau, 2005). Do niedawna twierdzono, że mRNA regulowane przez elementy ARE degradowane są przy udziale egzozomu, natomiast ostatnie doniesienia sugerują również zaangażowanie w procesy AMD degradacji rozpoczynającej się od końca 5' (Fenger-Gron, 2005; Stoecklin, 2006). Zgodnie z tym założeniem, czynnik TTP lokalizowany jest na terenie ciałek P. Pozbawienie komórek ssaczych komponentu ciałek P, jakim jest eIF4E-T, wstrzymuje procesy degradacji AMD, jednak dezaktywacja czynnika GW182, powodująca zupełną dezintegrację struktur P, nie zaburza degradacji indukowanej sekwencji ARE (Stoecklin, 2006; Fenger-Cron, 2005; Eulalio, 2007). Okazuje się, że degradacja mRNA na drodze AMD może być również regulowana za pomocą miRNA (Jing, 2005). Dzieje się tak w przypadku miR-16, który kieruje kompleks efektorowy RISC do RNA zawierających elementy ARE. Takie oddziaływania dodatkowo stabilizują wiązanie czynnika TTP w miejscu regulatorowym i stymulują rozkład transkryptu (Jing, 2005).

Dojrzewanie końców 3' innych produktów Polimerazy II: małych jądrowych i małych jądrowych RNA, wymaga obecności kompleksu egzozomu (Carroll, 2007). Białka zaangażowane w terminację transkrypcji genów kodujących snRNA, czy snoRNA są jednocześnie kofaktorami egzozomu. Proces ten został zbadany u drożdży, gdzie terminacja transkrypcji genów wymaga zaangażowania kompleksu białek Sen1 oraz Nrd1-Nab3. Białko Nrd1 może oddziaływać z domeną końcową karboksylową polimerazy i jednocześnie, wraz z białkiem Nab3, wiąże transkrypt, co powoduje zatrzymanie syntezy RNA (Gudipati, 2008; Vasilieva, 2008).

Polimeraza RNA II generuje również prekursorów małych RNA, jak miRNA, czy piRNA. Prekursorów tych cząsteczek podlegają kolejno sekwencyjnym cięciom za pomocą rybonukleaz należących do klasy III, jak Drosha, czy Dicer, by w efekcie uwolnić dojrzałe cząsteczki np. miRNA (Bartel, 2004). Zarówno pozostała cząsteczka prekursora, jak i niepasująca miRNA* podlegają następnie szybkiej degradacji, czego dowodem jest np. utrudniona detekcja tych elementów u organizmów rolinnych. Jako cząsteczki regulatorowe, podlegające czasowo- i tkankowo-specyficznej syntezie, miRNA są również

substratem dla swoistych RNaz. Cz sto warunki fizjologiczne komórki wymuszaj ich syntez , a nast pnie szybka eliminacja z cytoplazmy. Nukleaza odpowiedzialna za degradacje małych RNA, poczwszy od ich ko ca 3', jest enzym o nazwie Eri1, uczestniczy równie w pewnych etapach obróbki rRNA (Ansel, 2008; Gabel i Ruvkun, 2008). Wykazuje on zdolno do degradacji małych RNA tworzcych komplementarne dupleksy. U ro lin znane s równie specyficzne nukleazy SDNS (ang. *Small RNA Degrading Nucleases*), które degraduj małe jednoniciowe RNA i których aktywno wymagana jest dla prawidłowego rozwoju organizmu (Ramachandran i Chen, 2008a). Zarówno rybonukleazy z rodziny Eri1, jak i białka z rodziny SDNS, s zachowawcze ewolucyjnie u eukariontów.

Wyniki przeprowadzonych w ostatnich latach bada sugeruj , e w przypadku człowieka, czy dro d y, transkrypcji podlega znaczna cz genomu. W komórkach mog wi c by obecne liczne niepoznane, do tej pory RNA (Amaral, 2008). Wi kszo z nich jest prawdopodobnie syntetyzowanych za pomoc polimerazy RNA II. Niektóre z tych RNA mog by po prostu produktami ubocznymi, syntetyzowanymi ze wzgl du na niedokładno polimerazy i nieprecyzyjny odczyt sygnałów startu i zatrzymania transkrypcji (Stuhl, 2007). Wi kszo w ten sposób powstałych transkryptów cechuje brak stabilno ci oraz zdolno do szybkiej mobilizacji czynników odpowiedzialnych za ich degradacje , co mo e tłumaczy problem z detekcj tych cz steczek. Pewna cz jednostek transkrypcyjnych, które je koduj , wykazuje du e podobie stwo do typowych genów. Cz z nich mo e ulega syntezie zapocztkowanej z własnych promotorów, inne powstaj z intronów lub nici antysensowej genów koduj cych białka (Houseley i Tollervwy, 2009). Nie wiadomo, czy transkrypty te s funkcjonalne i jak rol odgrywaj w procesach metabolizmu RNA.

I.2.3.3. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol III

Polimeraza RNA, Pol III, odpowiada za syntez wielu konstytutywnych RNA, takich jak tRNA, 5S rRNA, U6snRNA oraz SRP (ang. *Signal Recognition Particle*) RNA. Dojrzewanie wi kszo ci z tych transkryptów jest mniej skomplikowane, ni składowanie produktów pozostałych polimeraz. Dojrzały koniec 5' tworzony jest zwykle w miejscu startu transkrypcji, natomiast ci cie w rejonie 3'-ko cowym generuje drugi koniec cz steczki. Wyj tek stanowi tRNA, u których w dojrzewanie obu ko ców zaangażowane s endonukleazy: RNaza P, która dokonuje ci cia w pobli u ko ca 5' cz steczki oraz RNaza Z, odpowiedzialna za dojrzewanie ko ca 3'. Po ci ciu z udziałem tej drugiej, do

ko ca 3' pre-tRNA przyłączane są dodatkowo trzy reszty nukleotydowe: CCA (Houseley i Tollervy, 2009). Warto również wspomnieć, że koniec 3' pre-tRNA, pre-5S RNA, SRP a także wielu prekursorów innych niekodujących RNA jest zwykle chroniony przed degradacją poprzez wiązanie białka La. Co więcej, udowodniono, że białko La nie tylko zabezpiecza przed poliadenylacją z udziałem kompleksu TRAMP lecz również uczestniczy w fałdowaniu niektórych tRNA (Copela, 2009).

Nasza wiedza na temat kontroli jakości cząsteczek RNA syntetyzowanych przez polimerazę III, jest zdecydowanie mniejsza niż w przypadku produktów pozostałych polimeraz. Stwierdzono, że zachodzi ona w jądrze przy udziale egzozomu. U drożdży w proces ten zaangażowany jest także kompleks TRAMP (Copela, 2008; Kadaba 2006). Wiadomo również, że tRNA z zaburzonym wzorem modyfikacji zasad azotowych jest eliminowany za pomocą egzozonukleazy 5' Rat1 czy XRN1 (Chernyakov, 2008). Ostatnie doniesienia sugerują, że cząsteczki tRNA mogą podlegać ściśnięciu w płci antykodonowej w odpowiedzi na warunki stresu oksydacyjnego a powstałe w ten sposób produkty degradacji są następnie akumulowane w komórce (Thompson, 2008).

Wiadomo, iż komórki eukariotyczne wykształciły wiele mechanizmów odpowiedzi na stres, chroniących przed jego następstwami. Należą do nich m. in.: zatrzymanie cyklu komórkowego, zmiany ekspresji genów i naprawa uszkodzeń DNA powstałych pod wpływem stresu. W sytuacji krytycznej, gdy uszkodzenia struktur komórkowych są zbyt duże, następuje indukcja apoptotycznej bądź nekrotycznej śmierci komórki. W tym komponentem odpowiedzi na stres jest kontrolowana zmiana metabolizmu RNA, co wyraża się zmianą wzoru syntezy i degradacji, zatrzymaniem translacji lub preferencyjną syntezą białek chroniących przed skutkami stresu. Ponieważ tRNA są podstawowym składnikiem maszyneryi biosyntezy białka, mogą one uczestniczyć w komórkowej odpowiedzi na stres. W sytuacji niedoboru aminokwasów w komórce, tRNA, które nie mogą ulec aminoacylacji, służą jako cząsteczki sygnałowe w procesie prowadzącym do aktywacji czynnika odpowiedzi na stres, kinazy białkowej Gcn2 (Dong, 2000; Hao, 2005). Dzieje się tak m. in. na skutek obsadzenia miejsc A rybosomów nieaminoacylowanymi tRNA i zatrzymania translacji. Wiadomo również, że w przypadku niedoboru aminokwasów u *Tetrachymena* i *Aspergillus* można zaobserwować akumulację produktów degradacji w szczególności rRNA, a także tRNA (Lee i Collins, 2005; Jochl, 2008). Podobne zjawisko zostało zaobserwowane 30 lat wcześniej, z tym, że dotyczyło akumulacji produktów degradacji tRNA u pacjentów chorych na raka, a poziom tej akumulacji w przybliżeniu odpowiadał wielkości guza (Borek, 1977; Speer, 1979). Jednak

mechanizm, który generuje obserwowane fragmenty oraz ich biologiczne znaczenie, pozostają, jak dotychczas, niewyjaśnione.

Ostatnie doniesienia informują o odkryciu puli małych cząstek RNA, składających się głównie z produktów degradacji tRNA i rRNA u bakterii *Streptomyces coelicolor* (Haiser, 2008), a także u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*), *Arabidopsis thaliana* oraz w ludzkich liniach komórkowych HeLa i ARPE-19 (Thompson, 2008). Produkty degradacji tRNA to zwykle fragmenty odpowiadające połowom cząstek, a wszelkie analizy wskazują na endonukleolityczne cięcia w płci antykodonowej, jako mechanizm odpowiedzialny za ich powstanie. Nie wiadomo jednak, czy cięcie jest generowane przez specyficzne białko, czy też ze względu na słabą jednoniciową strukturę i dostępność płci antykodonowa jest substratem dla nieswoistych enzymów. U *S. coelicolor* fragmenty tRNA i rRNA akumulowane są niezależnie od fazy wzrostu i składu podłoża, osiągając maksymalny poziom po 24 godzinach hodowli (Haiser, 2008). W przypadku organizmów eukariotycznych nie wydaje się, aby obserwowane produkty degradacji powstawały na skutek kontroli jakości RNA i trawienia nieprawidłowych cząstek. Poziom ich akumulacji u drożdży nie zależy bowiem od prawidłowego dojrzewania tRNA. W zamian za to, udowodniono, że ich produkcja znacząco wzrasta podczas zaistnienia różnego typu warunków stresowych w szczególności w trakcie stresu oksydacyjnego. Wzrost poziomu akumulacji produktów degradacji tRNA podczas stresu, nie zmienia natomiast puli dojrzałych funkcjonalnych tRNA, co wyklucza degradację w celu obniżenia poziomu biosyntezy białka (Thompson, 2008). To intrygujące zjawisko wydaje się dotyczyć wszystkich typów tRNA, choć w przypadku bakterii większość produktów degradacji dotyczy tRNA o najczęściej używanych antykononach (Haiser, 2008). Bez podania przyczyny tego zjawiska, trudno jest wysuwać wnioski co do potencjalnej funkcji akumulowanych produktów degradacji. Pewne hipotezy zakładają, że fragmenty te mogą być zaangażowane w transmisję sygnału podczas stresu lub też bezpośrednio oddziałują z maszyną translacyjną, hamując biosyntezę białka (Thompson, 2008). W rozwinięciu tego problemu mogą być pomocne obserwacje poczynione w trakcie testów nad lekiem antynowotworowym, RNaz o nazwie Onkonaza. Enzym ten dostając się do komórki guza indukuje apoptozę w sposób skorelowany z cięciami tRNA i inhibicją translacji (Saxena, 2002).

I.2.3.4. Degradacja RNA syntetyzowanych z udziałem polimerazy RNA Pol IVa i IVb

U organizmów rolinnych scharakteryzowano niedawno dwie polimerazy, Pol IV i Pol IVb, których aktywność jest związana z utrzymywaniem właściwej struktury chromatyny i zjawiskiem wyciszania na poziomie transkrypcyjnym (Wierzbicki, 2008). Ponieważ nieznane są substraty tych polimeraz, nie wiadomo w jaki sposób mogłaby zachodzić ich degradacja.

I.2.4. Dlaczego degradacja RNA jest bardzo efektywna?

Zarówno synteza, jak i degradacja RNA jest procesem niezwykle efektywnym, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie homeostazy komórki. Według danych literaturowych, w komórce istnieje swoista presja selekcyjna, skierowana przeciwko akumulacji przypadkowych fragmentów RNA. Wiadomo, że u drożdży z zablokowanym mechanizmem TRAMP, fragmenty rRNA i tRNA, które u szczepu dzikiego ulegają rozkładowi do pojedynczych nukleotydów, wchodzi na drogę procesów interferencji RNA (Buhler, 2008). Istnieje również zagrożenie, że akumulacja nadprogramowych krótkich cząstek mogłaby zaburzać replikację DNA oraz inne procesy komórkowe m. in. poprzez tworzenie się kompleksów DNA:RNA. Podobną sytuację obserwuje się w przypadku telomerowych ncRNA u drożdży z nieaktywnym egzozonukleazem Rat (Luke, 2008). Akumulacja nadprogramowych RNA powoduje wychwyt białek z cytoplazmy czy jądra, co pociąga za sobą deficyt tych cząstek (Houseley i Tollervwy, 2009). Innym bardzo ważnym atutem sprawnie działających systemów degradacji RNA, jest ochrona przeciwwirusowa. Niektóre grupy wirusów wnoszą do infekowanej komórki swój materiał genetyczny w postaci RNA, a następnie, na pewnym etapie wirulencji, używają komórkowych czynników do syntezy cząstek RNA na bazie własnych genomów. Wirusy te wykształciły wiele mechanizmów i adaptacji, w celu uniknięcia degradacji przez enzymy gospodarza. Niektóre wykorzystują czynniki gospodarza modyfikując własne transkrypty tak by naładowały tRNA lub mRNA (Hong, 1998).

Pomimo wielu przesłanek, wiadczych o sprawności systemów degradacji istnieją liczne dowody wiadczące o selektywnej akumulacji niektórych produktów po redukcji degradacji. Powstaje zatem pytanie, dlaczego pewne cząstki rozpadają się uwalniając stabilne produkty degradacji i czy produkty te pełnią jakąś funkcję, a jeśli tak, to jaką?

II. CEL PRACY

Poczynione w ostatniej dekadzie obserwacje dotyczące biogenezy i funkcji krótkich regulatorowych RNA skłoniły nas do postawienia hipotezy, w której jednym z istotnych ról tego typu cząstek mogą być stabilne produkty przejściowe powstające podczas degradacji komórkowych RNA (tzw. degradom RNA). Zasadniczym celem prowadzonych badań było zatem stwierdzenie, czy proces degradacji RNA zachodzi w sposób powtarzalny oraz czy prowadzi on do powstania stabilnych produktów przejściowych. Następnie staraliśmy się stwierdzić, czy akumulujące się w komórce degradanty mogą pełnić funkcje regulatorowe lub służyć jako specyficzne biomarkery.

Osiągnięcie tak zarysowanego celu wymagało realizacji następujących zadań szczegółowych:

- opracowania metodologii analizy degradomu RNA;
- ustalenia, w jakim stopniu degradom RNA jest tkankowo-specyficzny;
- zidentyfikowania odpowiedniej puli cząstek wchodzących w skład degradomu;
- zidentyfikowania cząstek, z których powstały poszczególne degradanty;
- ustalenia, czy zidentyfikowane degradanty wykazują komplementarność wobec transkryptów kodujących białka;
- określenia, w jaki sposób wybrane czynniki endo- i egzogenne wpływają na kształt degradomu RNA.

III. MATERIAŁY

III.1. Szczepy bakteryjne

Bradyrhizobium sp. lupini

Subcloning Efficiency™ DH5™ Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)

F- 80*lacZ* M15 (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk -, mk +) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* -

One Shot TOP10 Electrocompetent Cells (Invitrogen)

F- *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ* M15 *lacX74 recA1 araD139* (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

III.2. Materiał rolinny

Arabidopsis thaliana ecotyp Columbia

Mutanty:

Linia CS3089 (allel *dcl1-7*, locus At1g01040)

Linia SALK 064627 (allel *dcl2-1*, locus At1g03300)

Linia SALK 005512 (allel *dcl3-1*, locus At1g43920)

Linia SALK 160G05 (allel *dcl4-2*, locus At1g20320)

Lubin ółty *Lupinus luteus* odmiana Ventus

III.3. Gotowe zestawy odczynników

Zestaw do izolacji RNA:

MirVana™ miRNA Isolation Kit firmy Ambion

Zestaw do sekwencjonowania:

BigDye Terminator V1.1. Cycle Sequencing firmy Applied

Zestawy do oczyszczania kwasów nukleinowych:

GFX 96 PCR Purification Kit firmy GE Healthcare

NAP™ 10 Columns (Sephadex™ G-25 DNA Grade) firmy Amersham Biosciences

Zestaw do frakcjonowania RNA:

flashPAGE™ Fractionator Apparatus ; flashPAGE™ Buffer Kit (Type A); flashPAGE™

Pre-cast Gels (Type A) firmy Ambion

Zestaw do klonowania produktów PCR:

TOPO TA Cloning Kit firmy Invitrogen

III.4. Enzymy

Tab. III.1. Stosowane enzymy

Enzym	Nazwa firmy
PNK Kinaza	Fermentas/Invitrogen
Ligaza RNA	Promega
Ligaza DNA	Promega/Fermentas
Taq Polimeraza	Fermentas
Polimeraza Poli(A)	Ambion
ER Pst1	Fermentas
ER EcoR1	Fermentas
ER Ban1/BshNI	Fermentas
Odwrotna transkryptaza	Invitrogen

III.5. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy RNA wykorzystane do optymalizacji techniki dwukierunkowej elektroforezy (IBA BioTAGnology):

Oligo1 (40 nt/20A, 20G) Mw 13426,44

5' - GA - 3'

Oligo2 (40 nt/20A, 10G, 10C) Mw 13026,14

5' - CAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGA - 3'

Oligo3 (40 nt/8A, 32C) Mw 12337,48

5' - CCCCACCCACCCACCCACCCACCCACCCACCCACCCCA - 3'

Oligo4 (40 nt/20A, 10G, 10C) Mw 13026,14

5' - CACCAACCAACCAACCAACAAGAAGGAAGGAAGGAAGGAG - 3'

Oligonukleotydy przyłączone do końców cząsteczek RNA podczas klonowania (IDT Inc.):
3' End Donor Oligo (komercyjnie dostępny pod nazwą: *miRNA cloning linker*), koniec 3' zmodyfikowany poprzez dodanie dideoksynukleotydu

App17.91x: 5'-AppCTGTAGGCACCATCAAT/3ddC/- 3'

5' End Acceptor Oligo (hybryda RNA/DNA; sekwencja DNA oznaczona małymi literami)

17.93R: 5'-atcgtAGGCACCUGAAA-3'

Startery do odwrotnej transkrypcji:

15.22: 5'-ATTGATGGTGCCTAC-3' (IDT Inc.)

Smartban 5'-ATCGTAGGCACCTGAAAGGG-3' (Polgen)

RToligo1: 5'-CGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTX-3' (Polgen)

(X – oznacza dowolny nukleotyd)

RToligo2: 5'-ATCGTAGAATTCTGAAAGGG-3' (Polgen)

Startery do amplifikacji PCR:

17.92: 5'-ATTGATGGTGCCTACAG-3' (IDT Inc.)

17.93D: 5'-ATCGTAGGCACCTGAAA-3' (IDT Inc.)

Ampl3: 5'-GCGCTGCAGTTTTTTTTTTT-3' (Polgen)

M13F: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (dołączony do zestawu TOPO TA Cloning Invitrogen)

M13R: 5'-CAGGAAAVAGVTATGAC-3' (dołączony do zestawu TOPO TA Cloning Invitrogen)

Sondy stosowane podczas hybrydyzacji typu dot blot

Sondy komplementarne do wybranych cząsteczek biblioteki RNA70:

Sonda K1 GATTTGAACCAGAGACCTCG

Sonda K2 GGAATTGAACCCTCACGATT

Sonda K3 AATGAAACGAGAGCACTGCT

Sondy homologiczne do wybranych cząsteczek biblioteki RNA70:

Sonda P1 CGAGGTCTCTGGTTCAAATC

Sonda P2 AATCGTGAGGGTTCAAGTCC

Sonda P3 AGCAGTGCTCTCGTTTCATT

III.6. Wzorce długości RNA i DNA

18.113R: 5'-AGCGUAGGGAUCCAAA-3' (18 nt RNA); IDT Inc.

44.12R: 5'-GGCCAACGUUCUCAACAAUAGUGA-3' (24 nt RNA); IDT Inc.

M30: 5'-AGGATCCGAAGAAGAAAATGCCATTTGTGA-3'

(30 nt DNA); ARK Scientific

M42: 5'-GCGAAGCTTTGACCATTATTTTTTAATTTCTAATTTTACTTTA-3'

(42 nt DNA); ARK Scientific

M73: 5'-GGCAAGTGTTACCCGCGAGCAGAGGTTGGTACATGAACCTGCAACTG

TGTAATTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3' (73 nt DNA); IBB

MassRuler™ DNA Ladder Low Range; Fermentas

III.7. ele poliakrylamidowe (PAA)

- | | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| • Czciowo-denaturujcy el | 1X bufor TBE |
| PAA stosowany do rozdziału | 10% acrylamid:bisacrylamid (38:2) |
| preparatów RNA w pierwszym | 4 M mocznik * |
| kierunku | 0,1% APS |
| | 0,1% TEMED |

- | | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| • Czciowo-denaturujcy el | 1X bufor TBE |
| PAA stosowany do rozdziału | 20% acrylamid:bisacrylamid (38:2) |
| preparatów RNA w drugim | 4 M mocznik * |
| kierunku | 0,1% APS |
| | 0,1% TEMED |

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| • Denaturujcy el PAA | 0,5X bufor TBE |
| stosowany do frakcjonowania | 10% acrylamid:bisacrylamid (38:2) |
| preparatów RNA | 7 M mocznik |
| | 0,07 % APS |
| | 0,035% TEMED |

*Podczas optymalizacji techniki dwukierunkowej elektroforezy stosowano ele o rónej zawartości mocznika: el denaturujcy – 7 M mocznik, el czciowo-denaturujcy – 4 M mocznik, el natywny - bez mocznika.

III.8. Odczynniki

Ważniejsze odczynniki:

Odczynnik	Producent
Mocznik	POCh – Polskie Odczynniki
Tris-HCl	POCh
EDTA	Sigma
Kwas borowy	POCh; Sigma
Akrylamid	Sigma
Bis-akrylamid	Sigma
APS	Sigma
TEMED	Sigma
Chloroform	POCh
Fenol pH=4,3	ICN Biomedicals
Etanol	POCh
BB	Serva
XC	Serva
Formamid	Sigma
NaOH	Sigma
bł kit toluidyny	Serva
metanol	POCh
kwas octowy	POCh
chlorowodorek guanidyny	Sigma
MES	Sigma
-merkaptoetanol	Mekck
cytrynian sodu	Sigma
[³² P] ATP	Amersham
X-Gal	Fermentas
IPTG	Fermentas

III.9. Bufory

- Bufor do elektroforezy 0,9M TEB pH 8,3
 - 0,9 M Tris
 - 25 mM EDTA
 - 0,9 M H₃BO₃

- Bufor do elektroforezy TAE pH 8
 - 40 mM Tris
 - 1 mM EDTA

- Bufor TE pH 8
 - 10 mM Tris pH 7,5
 - 1 mM EDTA

- Bufor obciążający – denaturujący
 - (ang. *Gel Loading Buffer*)
 - 7 M mocznik
 - 0,1% BB
 - 0,1% XC
 - 0,1 M EDTA
 - 10 mM Tris-HCl pH 7,6

- Bufor obciążający – niedenaturujący
 - (Fermentas; ang. *Gel Loading Dye*)
 - 60% glicerol
 - 0,03% BB
 - 0,03% XC
 - 60 mM EDTA
 - 1 M cytrynian sodu pH 5,0

- Bufor barwiący RNA w celu PAA
 - 0,01% bł. kit toluidyny
 - 40% metanol
 - 1% kwas octowy

- Bufor lizujący do izolacji całkowitego RNA
 - pH 7
 - 8 M chlorowodorek guanidyny
 - 20 mM MES
 - 20 mM EDTA
 - 50 mM β-merkaptoetanol

-
- Bufor AMLI
25 mM Tris-HCl pH 8
10 mM EDTA/NaOH pH 8
50 mM Glukoza
2 mg.ml Lizozym
 - Bufor AMLII
0,2 N NaOH
1% SDS
 - Bufor A T4 PNK 10x (Fermentas)
500 mM Tris-HCl pH 7.6
100 mM MgCl₂
50 mM DTT
1 mM spermidyna
1 mM EDTA
 - Bufor B T4 PNK 10x (Fermentas)
500 mM imidazol-HCl pH 6,4
180 mM MgCl₂
50 mM DTT
1 mM spermidyna
1 mM EDTA
1 mM ATP
 - Bufor T4 RNA ligazy 10x
500 mM HERPES-NaOH pH=8,0
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
 - Bufor hybrydizacyjny
5x SSC
20 mM Na₂HP₄ pH 7,2
7% SDS
2x Roztwór Denhardta
 - Roztwór odmywaj cy I
3x SSC
25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5
5% SDS

- Roztwór odmywający II 1x SSC
1% SDS

III.10. Pożywki do hodowli bakterii

Pożywki do hodowli *Escherichia coli*:

Płynna pożywka LB – 0,5% ekstrakt drożdżowy; 1% trypton; 1% NaCl; pH 7,5

Pożywkę stałą przygotowywano dodając agar do uzyskania stężenia końcowego 1,5%.

Pożywkę (płynną bądź z agarą) po sterylizacji schładzano do temperatury ~50°C, a następnie dodawano antybiotyk selekcyjny: ampicylin (Sigma) - do uzyskania stężenia końcowego 100 µg/ml lub kanamycyn (Sigma) - do uzyskania stężenia końcowego 100 µg/ml.

Płynna pożywka SOC - 2% trypton; 0,5% ekstrakt drożdżowy; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukoza

Pożywkę sterylizowano przed dodaniem glukozy

Pożywki do hodowli *Bradyrhizobium lupini*

Płynna pożywka YMB – 0,05% K₂HPO₄; 0,02% MgSO₄; 0,01% NaCl; 1% mannitol; 0,04 % ekstrakt bacto-yeast; pH 7,0

Pożywkę stałą przygotowywano dodając agar do uzyskania stężenia końcowego 1,5%.

Pożywkę sterylizowano.

III.11. Pożywka stosowana do podlewania roślin łąkowego

Pożywki do podlewania roślin łąkowego zawierała:

0,525% A₂; 1% A₃; 1% A₄; 0,5% B; 1% C; 0,01% D; 0,5% EPF; 0,4% F; 0,01% I; 0,01% J

Pożywki pozbawiona azotu nie zawierała roztworów: D, I, J.

Tabela III.2. Skład roztworów stosowanych w powycie do podlewania roślin łubinu ółtego.

A ₂	MgSO ₄ x 7H ₂ O	98 g/l
A ₃	K ₂ SO ₄	85 g/l
A ₄	KCl	10 g/l
B	FeSO ₄ x 7H ₂ O	5,56 g/l
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	7,58 g/l
C	CaCl ₂ x 2H ₂ O	25,2 g/l
D	KNO ₃	102 g/l
EPF	MnSO ₄ x 5H ₂ O	4 g/l
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,905 g/l
	KJ	0,166 g/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1,72 g/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,005 g/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,016 g/l
	H ₃ BO ₃	1,24 g/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,05 g/l
F	KH ₂ PO ₄	68 g/l
I	NH ₄ H ₂ PO ₄	23 g/l
J	Ca(NO ₃) ₂ x 2H ₂ O	49,2 g/l

IV. METODY

IV.1. Hodowla *Arabidopsis thaliana*

Nasiona *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego (ecotyp Columbia), jak i mutantów wykładano na wilgotne podło e torfowe, wernalizowano 24 godziny w temperaturze -4°C i przenoszono do komór hodowlanych. Przez dwa dni ro liny hodowano w ciemno ci, nast pnie w stałych warunkach: temperatura 21°C , dzie 8 godzin. Ro liny podlewano wod co 2 dni.

W celu wywołania stresu osmotycznego do podło a zaaplikowano 150 mM roztwór NaCl. Po 6 godzinach hodowli ro liny zbierano i zamrano w ciekłym azocie, przechowywano w temperaturze -80°C do momentu izolacji RNA.

IV.2. Hodowla łubinu óltego

Nasiona łubinu óltego *Lupinus luteus* odmiany Ventus płukano pod bie c wod ok. 20 min i inkubowano 0,5 godziny w komorze sterylizacyjnej w roztworze 2,5% podchlorynu sodu z dodatkiem kilku kropel detergentu Tween 20. Nast pnie przemywano je jednokrotnie 50% etanolem oraz wielokrotne, sterylń wod dejonizowan . Po sterylizacji, nasiona pozostawiano w wodzie w celu sp cznienia, po czym wykładano na sterylne szalki Petriego z wilgotn bibuł . Szalki z nasionami, szczelnie owini te foli aluminiow , umieszczano na 2-3 dni w chłodziarce w temperaturze 6°C a nast pnie na 3 dni, w temperaturze 25°C . Skielkowane nasiona infekowano szczepem *Bradyrhizobium lupini*, inkubuj c je 0,5 godziny w zawieszynie bakteryjnej zawieraj cej roztwór magnezu. Siewki przenoszono do doniczek z perlitem. Ro liny hodowano w stałych warunkach: temperatura 24°C , dzie 11 godzin, codziennie zraszano wod , a co pi dni podlewano po ywk niezawieraj c azotu (Materiały III.11.). 24 i 75 dni po infekcji zbierano tkank brodawek korzeniowych, któr bezpo rednio po zebraniu zamrano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu izolacji RNA.

IV.3. Elektroforeza dwukierunkowa RNA w elach PAA (2D-E)

IV.3.1. Izolacja RNA

RNA z komórek roślinnych izolowano przy pomocy zestawu odczynników *MirVana* firmy Ambion (wg. protokołu producenta). W rezultacie uzyskiwano istotnie zwiększoną frakcję krótkich RNA (cząsteczki krótsze niż 200 nukleotydów).

IV.3.2. Znakowanie RNA na końcu 5'

RNA izolowany z komórek roślinnych znakowano radioizotopowo na końcu 5' stosując kinazę PNK oraz [³²P] ATP. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. IV.1.

Tabela IV.1. Skład mieszaniny reakcyjnej – znakowanie RNA

Składnik	Stężenie końcowe
RNA	1 µg
Bufor (exchange) 10 x st.	1x
[³² P] 5000 Ci/mmol	40 – 50 µCi
Kinaza PNK	10U
H ₂ O	Uzupełniano do 20 µl

Reakcje prowadzono w temperaturze 37°C przez 10 min (T4 Polinucleotide Kinase Invitrogen) lub 60 min (T4 Polinucleotide Kinase Fermentas).

Syntetyczne oligonukleotydy RNA wykorzystywane podczas optymalizacji techniki dwukierunkowej elektroforezy znakowano radioizotopowo na końcu 5' stosując kinazę PNK oraz [³²P] ATP. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. IV.2.

Tabela IV.2. Skład mieszaniny reakcyjnej – znakowanie oligonukleotydów RNA

Składnik	Stężenie końcowe
RNA	(2 µg, ~ 15 pmoli, 40 nt)
Bufor A PNK 10 x st.	1x
[³² P] 5000 Ci/mmol	10 µCi
Kinaza PNK	10U
H ₂ O	Uzupełniano do 20 µl

Reakcję prowadzono przez 30 min w temperaturze 37°C (T4 Polinucleotide Kinase Fermentas).

IV.3.3. Elektroforeza w pierwszym kierunku

Rozdział RNA prowadzono w 10% elu PAA z 4 M mocznikiem (eksperymenty testowe – mocznik opcjonalnie: 4 M, 7 M lub el natywny) w buforze 1xTEB pH 8 (Materiały III.9). Wymiary elu: 30x60x0,04 cm. Mieszanin RNA nakładano na el w buforze obciążającym (1:1). Elektroforez prowadzono przy napięciu prądu 300 V, przez 24 do 28 godzin, w temperaturze pokojowej.

IV.3.4. Elektroforeza w drugim kierunku

Po zakończeniu elektroforezy w pierwszym kierunku, wycinano pasek elu zawierający RNA o długości od 12 do 120 nt (pomiędzy barwnikami BB i XC zawartymi w buforze obciążającym, około 25 cm) i układano równolegle do krótszej krawędzi szyby (około 5 cm od górnej krawędzi). Pasek elu zatapiano w 10% elu PAA z 4 M mocznikiem (eksperymenty testowe – mocznik opcjonalnie: 4 M, 7 M lub el natywny). Po spolimeryzowaniu elu, w którym zatopiono pasek, pozostała wolna przestrzeń między szybami wypełniono 20% elu PAA z 4 M mocznikiem (eksperymenty testowe – mocznik opcjonalnie: 4 M, 7 M lub el natywny). Elektroforez prowadzono w temperaturze pokojowej w elu o wymiarach 30x40x0,04 cm w buforze 1xTEB pH 8 (Materiały III.9), stosując napięcie 500 V. Elektroforez zatrzymywano, gdy barwnik XC osiągnął dolną krawędź elu. Czas trwania elektroforezy w drugim kierunku wynosił od 22 do 25 godzin.

Po zakończeniu elektroforezy dwukierunkowej, uwidacziano znakowane RNA metodą autoradiografii. W tym celu stosowano klisze rentgenowskie (zwykle ok. 15 godzin ekspozycji w temperaturze pokojowej) oraz aparat do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo: Typhoon 8600 (Molecular Dynamic) wraz z oprogramowaniem ImageQuante 5.1 lub FujiFilm FLA 5100 wraz z oprogramowaniem MultiGauge 3.0 (czas ekspozycji ekranu około 1-15 godzin).

IV.4. Pozyskanie materiału do konstrukcji pełnej biblioteki RNA18-73

IV.4.1. Izolacja całkowitego RNA

Tkankę (około 5 gramów) ucierano w moździerzu (wymroźnionym ciekłym azotem), zawieszano w 2,5 obj. toci (około 12,5 ml) buforu zawierającego chlorowoderek guanidyny (Materiały III.9). Zawiesinę przenoszono do 50 ml probówki, wytrząsano 10 min (przy minimalnej prędkości), następnie wirowano 10 min przy 16000 rpm w temperaturze 4°C.

Faz wodn przenoszono do nowej probówki i oczyszczano RNA metod fenol-chloroform (Metody IV.4.2). Oczyszczony RNA wytrcano dodajc 1/9 obj to ci 3M octanu sodu pH 5,2 oraz 3 obj to ci 100% etanolu. Próbki inkubowano przez noc w temperaturze -20°C, a nastpnie wirowano przez 30 min przy 16000 rpm w 4°C. Osad przemywano schłodzonym 80% etanolem (4°C), osuszano i rozpuszczano w około 500 µl wody (traktowanej DEPC).

IV.4.2. Oczyszczanie RNA metod fenol-chloroform

Do fazy wodnej roztworu RNA dodawano 1 obj to mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (50:48:2), zawierajcej 8-hydroxy chinolin (0.1%), wytrcano i nastpnie wirowano 10 min przy 16000 rpm w temperaturze 4°C. Faz wodn przenoszono do nowej probówki i powtarzano ekstrakcj fenolem i chloroformem dwu – lub trzykrotnie. Nastpnie do zebranej fazy wodnej dodawano 1 obj to mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (48:2), zawierajcej 8-hydroxy chinolin (0.1%), wytrcano i wirowano 10 min przy 16000 rpm w temperaturze 4°C. Faz wodn przenoszono do nowej probówki i wytrcano RNA.

IV.4.3. Wstpnie frakcjonowanie całkowitego RNA za pomoc urz dzenia *Flash PAGE fractionator* firmy Ambion

Całkowity RNA (około 1-1,5 mg) poddawano wstpnemu frakcjonowaniu przy uyciu urz dzenia *Flash PAGE fractionator* firmy Ambion. Próbki zawierajce całkowity RNA dzielono na porcje (około 50 µl; maksymalnie 100µg RNA), ka d z porcji łczono z buforem obci aj cym w stosunku 1:1 i inkubowano 5 min w 95°C, a nastpnie odstawiano na lód (5 min). Jednorazowo na kolumn elow (dołczony do zestawu) nakładano maksymalnie 100µl próby z buforem obci aj cym (dołczony do zestawu). Elektroforez prowadzono przy stałym napi ciu 75-80 V (2-5 mA), przez około 22 min. Zbierano przes cz zawierajcy frakcj RNA o długo ci poni ej ~80 nt. Wytrcano RNA dodajc 1/9 obj. 3 M octanu sodu pH 5,2; 3 obj to ci 100% etanolu oraz glikogen do uzyskania st enia ko cowego 2 µg/ml. Próbki inkubowano przez noc w temperaturze -20°C, a nastpnie wirowano przez 30 min przy 16000 rpm w 4°C. Osad przemywano schłodzonym 80% etanolem (4°C), osuszano i rozpuszczano w wodzie traktowanej DEPC (około 50 µl).

IV.4.4. Oczyszczanie frakcji 18 - 73 nt RNA (RNA18-73) metod elektroforetyczn

Zag szczon , za pomoc urz dzenia *Flash PAGE*, frakcj RNA oczyszczano nast pnie metod elektroforezy w 10% elu PAA o wymiarach 15/15/0,1 cm w warunkach denaturuj cych (Materiały III.7). Do próby dodawano formamidowy bufor obci aj cy (Materiały III.9) w stosunku 1:1, inkubowano 10 min w temperaturze 65°C i odstawiono na lód (tak samo post powano z markerami wielko ci). Przed nało eniem próby, przez 30 minut prowadzono pre-elektroforez (przy napi ciu pr du 350 V). Elektroforez wła ciw prowadzono ok. 1,5 godz. przy napi ciu pr du 350 V, do momentu, gdy barwnik BB, osi gn ł 3/4 długo ci elu (~12 cm).

Po zako czeniu elektroforezy, el barwiono około 15 min w wodzie (DEPC) z dodatkiem bromku etydy (do uzyskania st enia ko cowego 0,26-0,3 µg/ml). Kieruj c si lokalizacj cz steczek markerowych, wycinano z elu fragment zawieraj cy RNA o długo ci od 18 do 73 nukleotydów. Fragment elu rozdrabniano i zalewano około 10 obj to ciami wagowymi 0,3 M NaCl. RNA eluowano przez noc w temperaturze 4°C (wytrz saj c, 200 rpm), nast pnie zbierano supernatant i powtarzano elucj przez 8 godzin. Zebrane frakcje ł czono i wytr cano RNA (dodaj c 3 obj to ci 100% etanolu i glikogen do uzyskania st enia ko cowego 2 µg/ml). Uzyskany RNA18-73 zawieszano w wodzie traktowanej DEPC (około 50 µl) .

IV.5. Ogólne zasady konstrukcji pełnej biblioteki RNA18-73

W celu uzyskania pełnej biblioteki RNA18-73 wykorzystano uzyskan wcze nie frakcj RNA (oczyszczon za pomoc urz dzenia *Flash PAGE* oraz metod elektroforetyczn). Poszczególne etapy konstruowania biblioteki obejmowały: przył czenie krótkich oligomerów do ko ców 3' i 5' cz steczek RNA, odwrotn transkrypcj , amplifikacj metod PCR, trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym, ł czenie strawionych DNA w długie ła cuchy (konkatamery), ligacj do wektora plazmidowego, transformacj bakterii produktami ligacji i sekwencjonowanie pojedynczych klonów.

Tworz c bibliotek wykorzystano nast puj ce opublikowane wcze niej:

- MicroRNA and siRNA Cloning Protocol - Bartel Lab Protocol; Lau et al. (2001) *Science*, 294, 858-6; (<http://web.wi.mit.edu/bartel/pub/>)
- Small RNA Cloning Protocol – Louise Chappell and Attila Molnar, the Sainsbury Laboratory; (http://www.tsl.ac.uk/dcb/services/Small_RNA_cloning_protocol.pdf)

- microRNA Cloning Protocol - MicroRNA cloning protocol, Dr Victor Ambros, Dartmouth Medical College; (<http://www.protocol-online.org/>).

IV.6. Ogólne zasady konstrukcji biblioteki RNA70

Na podstawie autoradiogramu dwukierunkowego rozdziału RNA (cz. stezki od 18 do ~73 nt pochodzące z liści *Arabidopsis thaliana*) wytypowano 70 najintensywniejszych plam odpowiadających cz. stezkom występującym w najwyższym stężeniu. Wycinano zawierające je fragmenty i łączono w trzy niezależne zbiory: frakcja 1 - plamy najintensywniejsze (24), frakcja 2 – plamy intensywne (29), frakcja 3 – plamy o średniej intensywności (17). Każdą frakcję zalewano ok. 10 obj. toczkami wagowymi 0,3M NaCl i eluowano z nich RNA (przez noc w temperaturze 4°C, wytrząsając z prędkością 200 rpm). Supernatant zbierano i ponownie poddawano 8 godzinnej elucji wyciągając te fragmenty elu.

Odpowiednie eluaty łączono i określano zawartość RNA w każdej frakcji poprzez pomiar radioaktywności. Następnie uzyskano mieszaniny wszystkich trzech frakcji pobierając takilo poszczególnych eluatów aby stężenie końcowe wszystkich wyizolowanych RNA było zbliżone. Wytrącano RNA poprzez dodanie etanolu. Osad RNA osuszano i rozpuszczono w wodzie traktowanej DEPC. Poszczególne etapy konstruowania biblioteki RNA70 były analogiczne, jak opisane powyżej, dla pełnej biblioteki RNA18-73.

IV.7. Konstrukcja bibliotek cDNA (identyczna dla obu bibliotek)

IV.7.1. Przyłączenie oligomeru do końca 3' cz. stezek RNA.

Reakcję przyłączenia oligomeru App17.91x do tworzących bibliotek cz. stezek RNA prowadzono w 50µl mieszaniny reakcyjnej, której skład podano w Tab. IV.3.

Tabela IV.3. Skład mieszaniny reakcyjnej – przyłączenie oligomeru App17.91x

Składnik	Stężenie końcowe
5x bufor do ligacji	1x
oligomer App 17.91	~ 4-6 µM
T4 RNA Ligase 10U/µl (Promega)	30U
Roztwór RNA	~ 35 µl
H ₂ O	Uzupełniano do 50 µl

Reakcję prowadzono 2 godziny w temperaturze pokojowej; bez udziału ATP. Po upływie 2 godzin reakcję zatrzymano dodając jedn. obj. toczki formamidowego buforu

obci ąj cego (Materiały III.9). Prób inkubowano 10 min w temperaturze 65°C, nast pnie odstawiano na lód. Zmodyfikowany RNA oczyszczano za pomoc elektroforezy w 10% elu PAA w warunkach denaturuj cych (Metody IV.4.4). Z elu wycinano fragment zawieraj cy cz steczki RNA o wielko ci od ~30 do 100 nukleotydów. RNA oczyszczano z elu w opisany poprzednio sposób (Metody IV.4.4), a nast pnie rozpuszczano w wodzie (około 30 µl) i stosowano w kolejnych etapach klonowania.

IV.7.2 Przył czanie oligomeru do ko ca 5' cz steczek RNA

Reakcj przył czania oligomeru 17.93R do RNA prowadzono w 30µl mieszaniny reakcyjnej, która skład podano w Tab. IV.4.

Tabela IV.4. Skład mieszaniny reakcyjnej – przył czanie oligomeru 17.93R

Składnik	St enie ko cowe
Bufor reakcyjny 10 x st ony (Promega)	1x
oligomer 17.93R	~20 µM
T4 RNA Ligase 10U/µl (Promega)	30U
RNA (po pierwszej ligacji)	~ 20 µl
H ₂ O	Uzupełniano do 30 µl

Reakcj prowadzono 6 godzin w temperaturze pokojowej. Reakcj zatrzymano dodaj c jedn obj to buforu formamidowego (Materiały III.9). Prób denaturowano termicznie poprzez inkubacj 10 min w 65°C i gwałtowne schłodzenie na lodzie. Zmodyfikowany RNA oczyszczano za pomoc elektroforezy w 10% elu PAA w warunkach denaturuj cych (Metody IV.4.4). Z elu wycinano fragment zawieraj cy cz steczki RNA o wielko ci od 50 do 110 nukleotydów. RNA wmywano z elu i wytr cano w opisany poprzednio sposób (Metody IV.4.4).

IV.7.3. Odwrotna transkrypcja - I

Do około 10 µl roztworu RNA uzyskanego po obu reakcjach przył czania oligomerów, dodawano 2 µl 100µM roztworu startera 15.22 i 20 µl H₂O. Mieszanin inkubowano 2 min w 72°C, nast pnie zwirowywano i pozostawiano 2 min na lodzie. Do próby dodawano pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej, której skład podano w Tab. IV.5.

Tabela IV.5. Skład mieszaniny reakcyjnej – odwrotna transkrypcja I

Składnik	Stężenie końcowe
5x First Strand Buffer	1x
dNTP	0,4 mM
DTT	8,57 M
Super Script III RT (200U/ μ l)	400U

Przed dodaniem enzymu mieszaninę ogrzewano 2 min w 48°C. Reakcję prowadzono 1 godzinę w temperaturze 48°C. Z uzyskanego cDNA, 5 μ l poddawano amplifikacji metodą PCR, a pozostały materiał przechowywano w temperaturze -20°C.

IV.7.4. Odwrotna transkrypcja - II (opcja alternatywna bez przyłączenia oligomeru do końca 5')

Do 12,6 μ l roztworu RNA uzyskanego po reakcji przyłączenia oligomeru do końca 3' dodawano 8,4 μ l mieszaniny Mix Oligo (5 μ M starter Smartban i 5 μ M starter 15.22.), inkubowano 2 min w temperaturze 72°C, zwirowywano i pozostawiono 2 min na lodzie. Następnie dodawano 16,8 μ l Mix RT (1x First Strand Buffer; 2,5 mM dNTP; 5 mM DTT) próbkę ogrzewano 2 min w 48°C, po czym inicjowano reakcję przez dodanie 600U odwrotnej transkryptazy Super Script II. Reakcję prowadzono 1 godzinę w temperaturze 48°C. Uzyskany cDNA poddawano amplifikacji metodą PCR.

IV.7.5. Amplifikacja cDNA

5 μ l roztworu cDNA, powstałego w reakcji odwrotnej transkrypcji, powielono w reakcji PCR, w 100 μ l mieszaniny reakcyjnej, której skład podano w Tab. IV.6. Warunki amplifikacji podano w Tab. IV.7.

Tabela IV.6. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Składnik	Stężenie końcowe
10x bufor reakcyjny (Fermentas)	1x
2mM dNTP	0,2 mM
25 mM MgCl ₂	1,35 mM
17.92 oligo	1 μ M
17.93D oligo	1 μ M
Taq Pol (Fermentas) 5U/ μ l	10 U
H ₂ O	Dopełniano do 100 μ l

Tabela IV.7. Warunki amplifikacji PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilo powtórze
Denaturacja wst pna	94°C	2 min	1
Denaturacja	94°C	30 sek	30
Hybrydyzacja	50°C	30 sek	
Elongacja	72°C	30 sek	
Elongacja ko cowa	72°C	5 min	1

Produkty reakcji PCR oczyszczano metod ekstrakcji fenol-chloroform (Metody IV.4.2). DNA wytrcano z roztworu przez noc w -20°C, dodaj c wcze niej 0,06 obj to ci 5 M NaCl oraz 3 obj. 100% etanolu. Prób wirowano przez 30 min z pr dko ci 16000 rpm w temperaturze 4°C. Osad przemywano schłodzonym 80% etanolem (4°C), osuszano i rozpuszczono w wodzie traktowanej DEPC. Jako produktów amplifikacji PCR sprawdzano rozdzielaj c je w 2% elu agarozowym.

IV.7.6. Trawienie restrykcyjne cz steczek cDNA

Produkty amplifikacji PCR trawiono enzymem restrykcyjnym Ban I w 300 µl mieszaniny reakcyjnej zawieraj cej: bufor reakcyjny (bufor „0” Fermentas) 1x, enzym restrykcyjny 0,67 U/µl. Reakcj prowadzono 4 godz w temperaturze 37°C. Produkty trawienia oczyszczano metod fenol-chloroform (Metody IV.4.2).

IV. 7.7. Ł czenie produktów trawienia cDNA w „konkatamery”

Trawiony enzymem BanI DNA rozpuszczano w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawieraj cej: 1x bufor do ligacji oraz 0,3U ligazy/µl. Reakcj prowadzono 6 godzin w temperaturze pokojowej. Nast pnie reakcj zatrzymywano poprzez dodanie niedenaturuj cego buforu obci aj cego. Cał mieszanin reakcyjn rozdzielano w 2% elu agarozowym (niskotopliwa agaroz: *GTG Nusive Agaroz*), zawieraj cym bromek etydyny (w st eniu ko cowym 0,2 µg/ml), w buforze 1x TAE (Materiały III.9). Produkty ligacji oczyszczano metod ekstrakcji z elu. Z elu wycinano fragment zawieraj cy konkatamery DNA długo ci od około 150 nt do 700 nukleotydów. Do rozdrobnionego elu dodawano 10 obj to ci wagowych buforu (*gel-melting solution*; Materiały III.9) i topiono inkubuj c około 10 min w temperaturze 65°C. DNA oczyszczano metod fenol-chloroform (Metody IV.4.2).

IV.7.8. Wprowadzanie cDNA do plazmidu pCR 2.1-TOPO

Ko ce konkatamerów cDNA wypełniano stosując enzym Taq Polimeraz (Fermentas). W tym celu do osadu konkatamerów cDNA dodawano poszczególne składniki mieszaniny reakcyjnej, której skład podano w Tab. IV.8.

Tabela IV.8. Skład mieszaniny reakcyjnej – wprowadzanie cDNA do plazmidu pCR2.1-TOPO

Składnik	Stosunek
10x bufor reakcyjny (Fermentas)	1x
2mM dNTP	0,2 mM
25 mM MgCl ₂	1,6 mM
Taq Pol (Fermentas) 5U/ μl	0,167 U/μl
H ₂ O	Dopełniano do 10 μl

Mieszanin inkubowano 5 min w temperaturze 72°C. Wprowadzanie cDNA do plazmidu pCR 2.1-TOPO przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu odczynników TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Mieszanin poligacyjnie odsalano stosując filtry 0,025 μm (Millipore Membrane Filters 0,025 μm).

IV.7.9. Transformacja bakterii

Elektro-kompetentne komórki One Shot TOP10 rozmrażano 15 min na lodzie, dodawano 5 μl oczyszczonej mieszaniny ligacyjnej, delikatnie wytrząsano i przenoszono do schłodzonej kuwetki elektroporacyjnej. Przeprowadzono elektroporację stosując następujące parametry: wolta - 2,5V, pojemność - 25 μF, opór - 200 Ω.

Po transformacji do bakterii dodawano 0,5 ml pożywki SOC i hodowano 45 min w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością 200 rpm. Następnie całą hodowlę bakteryjną przenoszono w porcjach: 2x50 μl, 100 μl i 200 μl na szalki z pożywką (LB z X-Gal: 7 μg/cm², ampicylina 100mg/ml). Po 12-16 godzinach inkubacji (w temperaturze 37°C) uzyskiwano pojedyncze kolonie bakterii. Koloniami bakteryjnymi o białym i lekko błękitnym zabarwieniu zaszczepiano 3ml płynnej pożywki LB (ampicylina 100 mg/ml). Hodowlę inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 300 rpm. Z hodowli izolowano plazmidowy DNA.

IV.7.10. Izolacja plazmidowego DNA

Hodowl bakteryjn po całonocnej inkubacji wirowano 2 min z pr dko ci 14 000 rpm w temperaturze 4°C. Po usuni ciu po ywki, do osadu bakteryjnego dodawano 100 µl roztworu ALM1 (Metody III.9). Bakterie zawieszono w roztworze i inkubowano na lodzie. Po 30 minutowej inkubacji dodano 200 µl wie o przygotowanego roztworu AML2 (Metody III.9), dokładnie wymieszano i inkubowano przez kolejne 5 min na lodzie. Dodawano 150 µl 3 M octanu sodu pH 4,8, nast pnie pozostawiono na lodzie przez 1 godzin , od czasu do czasu mieszaj c. Prób wirowano 5 min z pr dko ci 14 000 rpm w temperaturze 4°C. Zbierano około 0,4 ml supernatantu, przenoszono go do nowej probówki i dodawano 1 ml schłodzonego etanolu (4°C). Pozostawiono na minimum 30 min w temperaturze -20°C, nast pnie wirowano 15 min z pr dko ci 14 000 rpm. Dokładnie usuwano supernatant, a osad rozpuszczano w 100 µl 0,1 M octanu sodu pH 6. Dodawano 200 µl schłodzonego etanolu (4°C), pozostawiono próbki na minimum 10 min w temperaturze -20°C i ponownie wirowano z szybko ci 14 000 rpm. Supernatant usuwano a uzyskany osad suszono i rozpuszczano w 40 µl buforu TE (Metody III.9).

IV.7.11. Analiza klonów bakteryjnych

W celu sprawdzenia czy uzyskane plazmidy zawieraj inserty o po danej wielko ci poddawano je trawieniu enzymami restrykcyjnymi - skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. IV.9.

Tabela IV.9. Skład mieszaniny reakcyjnej – trawienie restrykcyjne plazmidowego DNA

Składnik	St enie ko cowe
Roztwór plazmiu	4 µl
10x bufor reakcyjny (Fermentas)	1x
Enzym EcoRI	0,167 U/µl
RNaza A	0,033 µg/ µl
H ₂ O	Dopełniano do 15 µl

Trawienie restrykcyjne prowadzono od 2 do 4 godzin w temperaturze 37°C. Mieszanin reakcyjn analizowano metod elektroforezy w 2% elu agarozowym (zawieraj cym bromek etydyny). Do dalszych bada wybierano plazmidy zawieraj ce inserty o wielko ci od 150 do 700 nt.

IV. 7.12. Sekwencjonowanie.

Wyselekcjonowane plazmidy poddawano sekwencjonowaniu przy użyciu zestawu BigDye Terminator V1.1. Cycle Sequencing firmy Applied Biosystems w aparacie ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. IV.10, a warunki w jakich prowadzono reakcję sekwencjonowania w Tab. IV.11.

Tabela IV.10. Skład mieszaniny reakcyjnej – reakcja sekwencyjonowania

Składnik	Stężenie końcowe
Plazmid	150-300 ng
5x Big Dye Sequencing Buffer	1x
Starter M13R	3 pmole
50%DMSO	5%
Terminator Ready Reaction Mix V1.1	1 µl
H ₂ O	Dopełniano do 20 µl

Tabela IV.11. Warunki reakcji sekwencyjonowania

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	96°C	1 min	1
Denaturacja	96°C	30 sek	30
Hybrydyzacja	50°C	30 sek	
Elongacja	60°C	3 min	
Elongacja końcowa	60°C	5 min	1

Oczyszczanie mieszaniny reakcyjnej odbywało się według protokołu zamieszczonego poniżej:

- Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 µl 125 mM EDTA oraz 50 µl 100% etanolu. Wytrząsano przez kilka sekund i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 min.

- Próbkę wirowano 30 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant dokładnie usuwano. W celu usunięcia resztek soli osad przemywano schłodzonym 70% etanolem.

- Wirowano 10 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant usuwano, osad dokładnie suszono a następnie rozpuszczano w 10 µl formamidu.

IV.8. Klonowanie indywidualnych cz. steczek RNA izolowanych z elu

Na podstawie autoradiogramu dwukierunkowego rozdziału preparatu RNA pozyskanego z liści *Arabidopsis thaliana* (Metody IV.3) wytypowano najintensywniejsze plamy a następnie wycięto zawierające je fragmenty elu. Każde z wyciętych fragmentów rozdrobiono, umieszczono w osobnej probówce, a po dodaniu około 10 obj. toci wagowych 0,3 M NaCl, eluowano z niego RNA (przez noc w temperaturze 4°C, wytrząsając z prędkością 200 rpm). Supernatanty zbierano, a wycięte fragmenty elu ponownie poddawano 8 godzinnej elucji. Uzyskane po wytrącaniu etanolem osady RNA osuszano.

IV.8.1. Poliadenylacja końca 3' cz. steczek RNA

Każde z wyizolowanych cz. steczek RNA poddano reakcji poliadenylacji. Do osadu RNA (straconego za pomocą etanolu) dodawano pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej, której skład podano w Tab. VI.12.

Tabela IV.12. Skład mieszaniny - poliadenylacja RNA

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor PAP (Ambion)	1x
MnCl ₂	2,5 mM
ATP	1 mM
PAP enzym (Ambion)	0,4U/μl
H ₂ O	Dopełniano do 20μl

Reakcję prowadzono 1 godzinę w temperaturze 37°C.

Po reakcji poliadenylacji, RNA poddawano odwrotnej transkrypcji (Metody IV.7.4) stosując mieszaninę starterów (Mix Oligo: 5 μM starter RToligo1 i 5 μM starter RToligo2). Uzyskany cDNA amplifikowano w reakcji PCR (Metody IV.7.5), stosując jako startery RToligo2 i Ampl3 (Materiały III.5).

IV.8.2. Trawienie restrykcyjne cz. steczek cDNA oraz plazmidu pUC19

Produkty amplifikacji PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi EcoR1 i Pst1 w 50μl mieszaninie reakcyjnej zawierającej: bufor reakcyjny (bufor „0+” Fermentas) 1x, enzymy restrykcyjne 0,5U/μl każde. Reakcję prowadzono 4 godz. w temperaturze 37°C. Produkty trawienia oczyszczano metodą fenol-chloroform (Metody IV.4.2).

Jednocześnie nie tymi samymi enzymami trawiono 0,5 µg plazmidu pUC19. Po trawieniu plazmid oczyszczano z wykorzystaniem zestawu odczynników GFX 96 PCR Purification Kit GE Healthcare (zgodnie z protokołem producenta).

IV.8.3. Wprowadzanie cDNA do plazmidu pUC19

Do uzyskanych osadów zawierających produkty trawienia cDNA (stronę 13 za pomocą etanolu) dodano poszczególne składniki mieszaniny ligacyjnej – Tab IV.13.

Tabela IV.13 Skład mieszaniny reakcyjnej – wprowadzanie cDNA do plazmidu pUC19

Składnik	Stężenie końcowe
10x bufor do ligacji	1x
pUC19 (po trawieniu)	50 ng
DNA Ligase 2-3U/µl (Promega)	0,2U/µl
H ₂ O	Uzupełniano do 10µl

Reakcję prowadzono przez noc w temperaturze 4°C, następnie mieszaninę reakcyjną transformowano bakterie.

IV.8.4. Transformacja bakterii

Chemi-kompetentne komórki DH5 (100µl) rozmrażano 15 min. na lodzie, dodawano 10 µl mieszaniny ligacyjnej (Tab. IV.13), delikatnie mieszano i pozostawiono kolejne 30 min na lodzie. Przeprowadzono stres cieplny 40s w temperaturze 42°C następnie bakterie ponownie odstawiano na lód. Kolejne etapy hodowli bakterii po transformacji przebiegały według opisu zamieszczonego w rozdziale Metody IV.7.9.

Z hodowli bakteryjnej izolowano plazmidowy DNA (Metody IV.7.10) a uzyskane pojedyncze klonów poddawano sekwencjonowaniu przy użyciu zestawu BigDye Terminator V1.1. Cycle Sequencing firmy Applied Biosystems oraz aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Metody IV.7.12).

IV.9. Hybrydyzacja typu Dot blot

IV.9.1. Elektrotransfer

Do poszczególnych RNA, izolowanych z fragmentów elu zawierających pojedyncze plamy, dodawano EDTA do stężenia końcowego 5 mM. Próby denaturowano termicznie 5

min w temperaturze 65°C, następnie inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej i dodawano roztwór 20x SSC w stosunku 1:1. Tak przygotowane preparaty RNA nakładano kolejno do studzienek aparatu SRC-96 Minifold-Vakuum-Filtrationssystem (Schleicher&Schuell). Stosując elektrotransfer, ka d z prób przenoszono na filtr nylonowy (Hybond-N+; Amersham Biosciences) o rozmiarach 8cm/12,5 cm, umieszczony wczepnie na bibule Whatman 3MM w aparacie. Bibuła i filtr nylonowy przed umieszczeniem w aparacie zmoczono roztworem 10x SSC. Po transferze RNA, filtr dodatkowo przemywano roztworem 10x SSC, a następnie suszono w temp. pokojowej. RNA, wiązane z membranami przez inkubację w temperaturze 80°C przez 2 godziny.

Ponieważ eluaty RNA nanoszone na filtr nylonowy, pochodziły z preparatu znakowanego radioizotopowo, dokonano pomiaru radioaktywności przy użyciu urządzenia do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo. Filtr umieszczony był w kasecie z ekranem przez około 30 min. Odczyt pozwolił na uzyskanie obrazu wyjściowego, porównawczego dla kolejnych analiz.

IV.9.2. Prehybrydyzacja

Filtr ze związanymi cząsteczkami RNA przepłukano 2x SSC i umieszczono w cylindrze do hybrydyzacji. W celu zablokowania miejsc mogących niespecyficznie wiązać kwasy nukleinowe przeprowadzono tzw. prehybrydyzację. Porcję buforu prehybrydyzacyjnego (Materiały III.9), ok. 25 ml, podgrzano do 50°C do zupełnego rozpuszczenia składników, następnie dodawano zdenaturowany termicznie preparat DNA spermy łosia do stężenia końcowego 400µg/ml. Roztwór prehybrydyzacyjny dodawano do cylindra z umieszczonym wewnątrz filtrem. Prehybrydyzację prowadzono przez noc w temperaturze 50°C, delikatnie wytrząsając.

IV.9.3. Przygotowanie sond DNA

Sondy DNA (Materiały III.5) zaprojektowano w oparciu o sekwencje zidentyfikowane w bibliotece wyselekcjonowanych RNA18-73.

Wybrane sondy (oligonukleotydy DNA), o sekwencji komplementarnej do najczęściej występujących cząsteczek biblioteki wyselekcjonowanych RNA18-73, znakowano radioizotopowo na końcu 5' przy użyciu kinazy PNK oraz [³²P] ATP. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. IV.14.

Tabela IV.14. Skład mieszaniny reakcyjnej - znakowanie sond DNA

Składnik	Stężenie kołowe
Roztwór RNA	(~20 nt, 20 pmoli)
Bufor A PNK 10 x st.	1x
[³² P] 5000 Ci/mmol	10 μCi
Kinaza PNK	10U
H ₂ O	Uzupełniano do 20 μl

Reakcję prowadzono 30 min w temperaturze 37°C (T4 Polinucleotide Kinase Fermentas).

Mieszaninę reakcyjną oczyszczano stosując zestaw NAPTM 10 Columns (SephadexTM G-25 DNA Grade; Amersham Biosciences) według zaleceń producenta. Za pomocą licznika scyntylicyjnego dokonywano pomiaru radioaktywności sondy.

IV.9.4. Hybrydyzacja

Z cylindra z umieszczonym wewnątrz filtrem nylonowym usuwano roztwór prehybrydyzacyjny. Do nowej porcji buforu, 10 ml, dodawano wyznakowane radioizotopowo i zdenaturowane termicznie sondy DNA w ilości 5 000 000 cpm. Hybrydyzację prowadzono przez noc w temperaturze 50°C, delikatnie wytrząsając. W kolejnych eksperymentach testowych obniżano temperaturę hybrydyzacji kolejno do 45°C i 40°C.

IV.9.5. Odplukiwanie

Po zakończeniu hybrydyzacji usuwano bufor hybrydyzacyjny i przepłukiwano filtr 30 ml buforu odmywającego I (Materiały III.9). Następnie płukano membranę 3-krotnie przez 30 min, każdorazowo w 30 ml buforu odmywającego I, w temperaturze hybrydyzacji. Następnie filtr przenoszono do naczynia zawierającego bufor odmywający II (Materiały III.9) i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej. Po odplukaniu, filtr odszczynano z nadmiaru płynu i umieszczano w szczelnym foliowym woreczku. Dokonywano pomiaru radioaktywności. W tym celu stosowano aparat do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo (filtr umieszczony był w kasecie z ekranem przez 0,5 - 24 godziny).

V. WYNIKI

V.1. Analiza degradacji RNA

Pi lat temu, czyli w chwili rozpoczęcia badań prezentowanych w niniejszej rozprawie, pojęcie degradacji RNA praktycznie nie występowało w literaturze wiatowej. Dopiero w ostatnich kilku latach zaczęły pojawiać się pierwsze prace dotyczące analizy stabilnych produktów degradacji RNA. Podstawowym problemem, jaki należało rozwiązać przed przystąpieniem do jakichkolwiek eksperymentów było właściwie precyzyjne zdefiniowanie obiektu badań oraz opracowanie ich metodyki. Wstępnie przyjęto zatem, że degradacją RNA nazywamy zbiór wszystkich cząstecek, które powstały w wyniku rozpadu wiązanych funkcjonalnych RNA i z jakimi względów nie zostały zdegradowane do pojedynczych nukleotydów. W zależności od tego, z jakiego materiału wyizolowany został RNA możemy mówić o różnych typach degradacji np. komórkowym lub tkankowym.

Zgodnie z przyjętą definicją elementem degradacji będą zarówno wieloletnie cząstecki powstałe w rezultacie rozpadu transkryptów pierwotnych jak i kilkudziesięcio- czy kilkunastonukleotydowe produkty degradacji tRNA. Nie ulega wątpliwości, że analiza takiej puli molekuł nastręcza wiele trudnych do pokonania problemów. Po pierwsze, wymaga znajomości całego transkryptomu badanych komórek lub tkanek. Brak informacji na temat wszystkich syntetyzowanych transkryptów nie pozwala stwierdzić czy dany RNA istotnie powstał w wyniku degradacji. Po drugie, obecnie nie dysponujemy odpowiednim przyrządem umożliwiającym systematyczne badania tak znormalizowanych cząstecek RNA. Taki stan rzeczy wymusza ograniczenie zbioru badanych RNA do tych, o których z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić możemy, że są produktem degradacji. Biorąc pod uwagę wielkość różnego typu RNA zdecydowano by w pracy tej skupić się wyłącznie na cząsteckach mniejszych od tRNA. Analizowana pula powinna zatem zawierać głównie produkty degradacji oraz krótkie regulatorowe RNA.

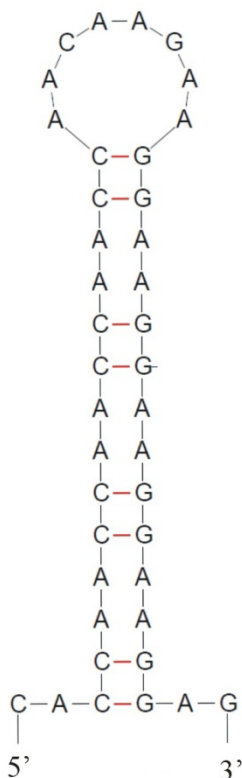
Kolejnym problemem był dobór odpowiedniej metodyki badawczej. W pierwszej chwili służyłoby nam, np. tzw. głębokie sekwencjonowanie (ang. *deep sequencing*) bardzo optymalną metodą. Należy jednak pamiętać, jaki był stan zaawansowania tej technologii przed kilkoma laty. Metoda 454 firmy *LifeScience*, oferowała sekwencjonowanie ograniczonej puli (około 500 000) dłuższych tj. około 300-500 nt odcinków DNA/RNA. Bardziej przydatna do naszych celów metoda *Solexa* firmy Illumina pozwalała uzyskać sekwencje zdecydowanie większej liczby molekuł jednak nie dłuższych jak 30 nt. Dodatkowo

w chwili rozpoczęcia badań nie byliśmy w stanie jednoznacznie stwierdzić, z jak liczbą, jak zróżnicowanych cząstek będziemy mieli do czynienia. Biorąc pod uwagę powyższe względy postanowiono opracować metodologię analizy degradacji RNA w oparciu o klasyczne techniki rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych (PAA). W tym celu posłużyliśmy się, opisanymi w latach 70 ubiegłego stulecia, metodami dwukierunkowej elektroforezy cząstek RNA.

V.1.1. Optymalizacja techniki dwukierunkowej elektroforezy (2D-E) RNA – badania modelowe

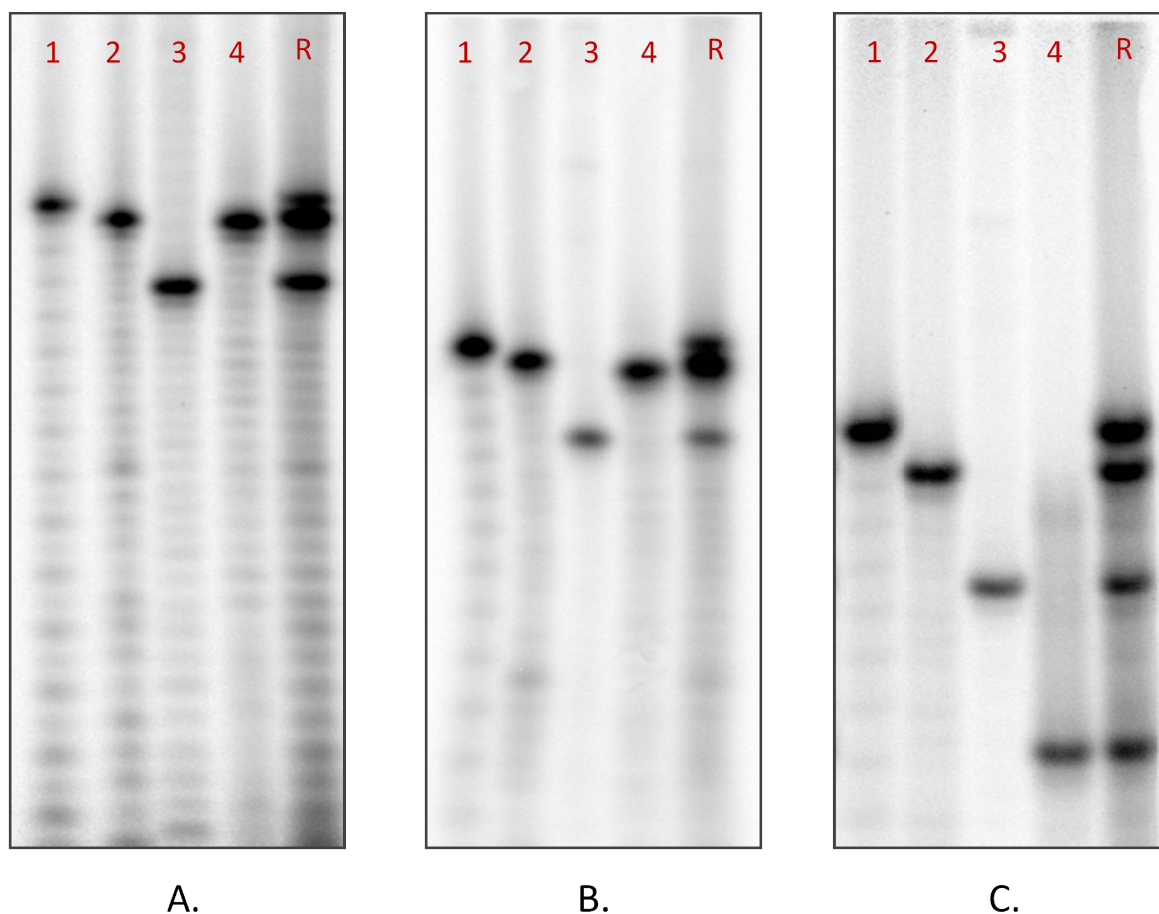
Podstawowy problem, jaki należało rozwiązać przed przystąpieniem do właściwych badań, dotyczył wpływu denaturacji na rozdzielczość wybranej metody. Aby go rozwiązać, przeprowadzono szereg rozdzielczych żelów PAA o różnej zawartości mocznika. Rozdzielane próbki stanowiła mieszanina syntetycznych oligonukleotydów RNA o zaprojektowanej sekwencji (Materiały III.5). Długość każdej cząstki w mieszaninie wynosiła 40 nt. Oligonukleotyd oznaczony cyfrą 1 charakteryzował się największą masą cząsteczkową (M_w 13426,44) ze względu na znaczny przewagę reszt guanozyny. W sekwencji cząstki oznaczonej cyfrą 2 dominowały reszty adenozyne, stąd też jej masa cząsteczkowa była odpowiednio mniejsza (M_w 13026,14). Najlżejszą cząstką był bogaty w reszty cytozyny oligonukleotyd 3 (M_w 12337,48). Sekwencja wszystkich wyżej wymienionych oligonukleotydów została zaprojektowana w taki sposób, aby uniemożliwić tworzenie się stabilnych struktur drugorzędowych i oddziaływań między cząstkami. W ten sposób zminimalizowano wpływ struktury drugorzędowej na szybkość migracji tych cząstek w żelach PAA. Ostatni oligonukleotyd, oznaczony cyfrą 4, odpowiadał masie cząsteczkowej i składem nukleotydowym cząstce nr 2. Jednak kolejno zmieniona kolejność nukleotydów w jego sekwencji powodowała, iż mógł on przybrać stabilną strukturę typu spinki do włosów o temperaturze topnienia T_m wynoszącej około 52°C (Rys. V.1).

- Oligo1** (40 nt/20A, 20G) Mw 13426,44
 5' - GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA - 3'
- Oligo2** (40 nt/20A, 10G, 10C) Mw 13026,14
 5' - CAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACA - 3'
- Oligo3** (40 nt/8A, 32C) Mw 12337,48
 5' - CCCCACCCCACCCCACCCCACCCCACCCCACCCCACCCCA - 3'
- Oligo4** (40 nt/20A, 10G, 10C) Mw 13026,14



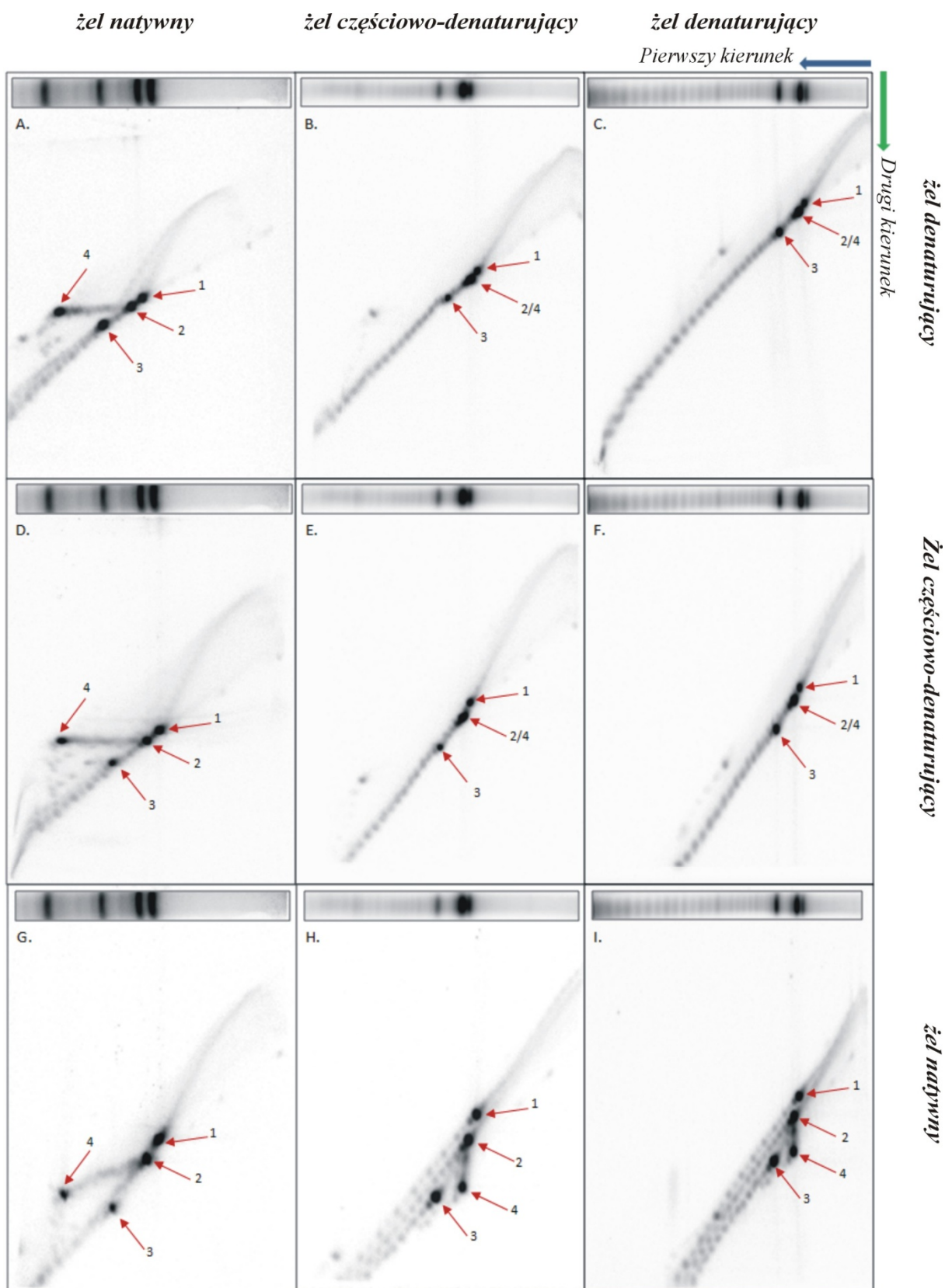
Rysunek V.1. Syntetyczne oligonukleotydy RNA. Jedynie cz. steczka *Oligo4* mogła przyjmować stabilną strukturę typu spinki do włosów ($T_m \sim 52^\circ\text{C}$).

Mieszanie wszystkich czterech oligonukleotydów znakowano radioizotopowo i rozdzielano w elach poliakrylamidowych w dwóch kierunkach. Rozdziały w pierwszym kierunku prowadzono w 10% elu PAA o różnym stężeniu mocznika: el denaturujący (7 M mocznik), el częściowo-denaturujący (4 M mocznik) oraz w elu natywnym, niezawierającym mocznika (Rys. V.2). Uzyskany za pomocą autoradiografii obraz wykazał, iż najefektywniejszy rozdział uzyskano w elu natywnym.



Rysunek V.2. Rozdział eklektroforetyczny w pierwszym kierunku mieszaniny syntetycznych oligonukleotydów. A – el denaturuj cy (7 M mocznik); B – el cz ciowo-denaturuj cy (4 M mocznik), C – el natywny bez mocznika. 1-4 numery rozdzielanych oligonukleotydów (opis w tek cie); R – mieszanina wszystkich oligonukleotydów. Obraz uzyskano za pomoc aparatu do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo.

Rozdzielone w ró nych warunkach oligonukleotydy RNA poddano elektroforezie w drugim kierunku. Prowadzono j w 20% elu PAA stosuj c ró ne st enie mocznika: el denaturuj cy – 7 M mocznik, el cz ciowo-denaturuj cy – 4 M mocznik oraz el natywny, bez mocznika. Uzyskane za pomoc autoradiografii obrazy dwukierunkowego rozdziału RNA przedstawiono na Rys. V.3. Okazało si , i równie w tym przypadku najlepszy rozdział uzyska mo na stosuj c w drugim kierunku ele natywne. Dodatkowo stwierdzono, e w elu natywnym dochodzi do znacznego rozmycia sygnału pochodz cego od poszczególnych próbek, czyli do tzw. smu enia, które w przypadku du ej liczby analizowanych cz steczek mo e istotnie utrudnia analiz uzyskiwanych obrazów.



Rysunek V.3. Autoradiogramy uzyskane w wyniku rozdziału mieszaniny syntetycznych oligonukleotydów RNA metod 2D-E, 1-4 numery oligonukleotydów (opis w tekście).

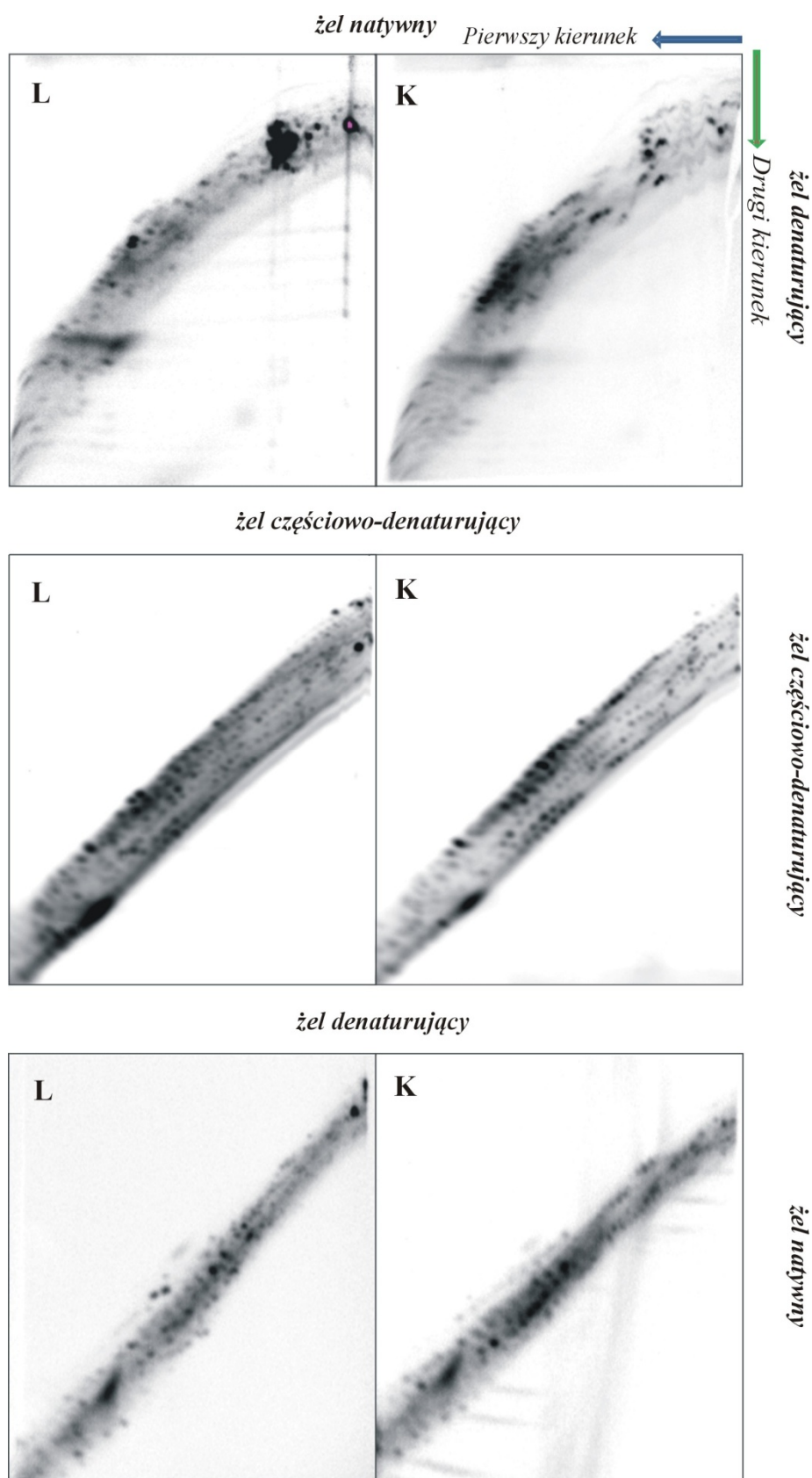
V.1.2. Analiza 2D-E frakcji krótkich RNA z *A. thaliana*

Przedstawione powyżej do wiadomości nie pozwoliły wyciągnąć jednoznacznych wniosków, który z zastosowanych układów eksperymentalnych najlepiej nadaje się do analizy preparatów zawierających mieszaninę stosunkowo krótkich RNA. Postanowiono zatem przetestować kilka wybranych układów stosując izolaty uzyskane z jednego z modelowych organizmów. Ze względu na brak jakichkolwiek danych literaturowych odnoszących się do tego zagadnienia zdecydowano by podstawowym obiektem badań uczynić najlepiej poznany organizm roślinny, jakim bezsprzecznie jest *Arabidopsis thaliana*.

A. thaliana, czyli rzodkiewnik pospolity posiada stosunkowo mały, dobrze opisany genom jądrowy (5 chromosomów, 124,000 000 pb/haploidalna kopia). W pełni poznana została również sekwencja genomu plastydowego i mitochondrialnego. Dodatkowym atutem tej rośliny jest jej krótki cykl życiowy, łatwa uprawa, samopylna oraz produkcja dużych ilości nasion (~10 000/roślina). O wyborze rzodkiewnika, jako modelu badawczego, przesądziły jednak przede wszystkim: solidna baza literaturowa m. in. z zakresu małych regulatorowych RNA i swobodny dostęp do informacji zawartych w specjalistycznych bazach danych. Wziąć to również pod uwagę fakt, iż istnieje szeroka oferta komercyjnie dostępnych mutantów *A. thaliana*.

V.1.2.1. Optymalizacja warunków analizy frakcji krótkich RNA z *A. thaliana*

Aby zoptymalizować warunki analizy zdefiniowanej wcześniej puli cząstek, wyizolowano RNA z liści oraz korzeni 35-dniowych roślin *A. thaliana*. W tym celu posłużono się zestawem *mirVana* firmy Ambion (Metody IV.3.1). Wykorzystuje on dwa sposoby oczyszczania RNA: ekstrakcję fenol-chloroform i immobilizację cząstek RNA na filtrach silikonowych. Otrzymane w ten sposób preparaty (zwane dalej RNA<120) posiadały istotnie zwiększoną frakcję krótkich RNA (cząsteczki krótsze niż 200 nukleotydów) i pozbawione były znacznej części dłuższych cząstek RNA. Znakowano je radioizotopowo (Metody IV.3.2) i rozdzielano w 10% elu PAA w warunkach natywnych, cząstkowo denaturujących oraz denaturujących (Metody IV.3.3). Następnie wycinano z elu paski zawierające rozseparowane RNA (w zakresie od 12 do 120 nt - szacowano na podstawie migracji barwników BB i XC) i poddawano je rozdzielaniu w drugim kierunku (Metody IV.3.4). Rozdział w drugim kierunku prowadzono w elu 20%, odpowiednio: denaturującym, cząstkowo-denaturującym oraz natywnym. Uzyskane rezultaty przedstawione zostały na Rysunku V.4.

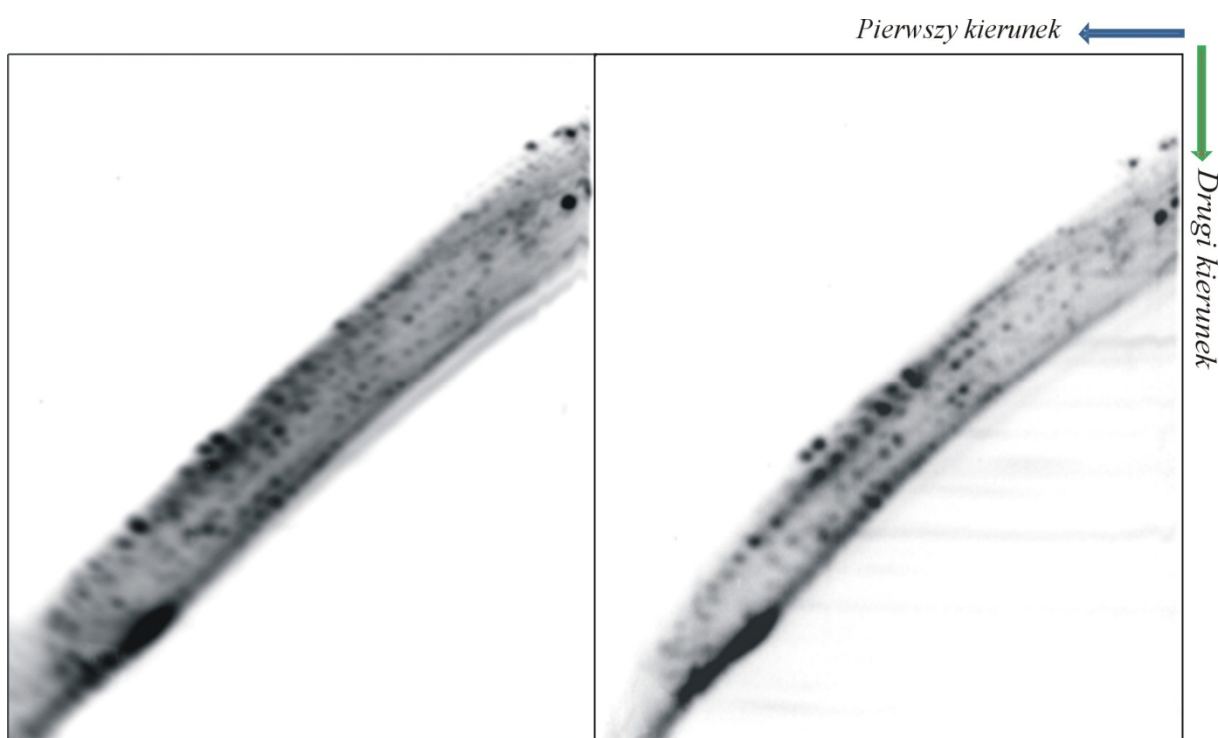


Rysunek V.4. Autoradiogramy uzyskane w wyniku rozdziału frakcji RNA<120 metod 2D-E podczas optymalizacji warunków rozdziału. L – frakcja RNA<120 liścia, K - frakcja RNA<120 korzenia *A. thaliana*

Na podstawie analizy otrzymanych autoradiogramów zdecydowano by wszystkie kolejne rozdziały metod dwukierunkowej elektroforezy (2D-E) prowadzone były w elach cz ciowo denaturuj cych.

V.1.2.2. Polimorfizm frakcji krótkich RNA z *A. thaliana*

Aby stwierdzi jak zmienna jest frakcja krótkich RNA powtórzono wielokrotnie analiz preparatów RNA<120 izolowanych z li ci 35 dniowych ro lin *A. thaliana*. Izolacja RNA przeprowadzana była zawsze w ten sam sposób, zgodnie z opisanym wcz niej schematem (Metody IV.3.1). W ka dym eksperymencie wykorzystywano ro liny pochodz ce z innej hodowli, prowadzonej jednak zawsze w tych samych ci le kontrolowanych warunkach (Metody IV.1). Otrzymany RNA znakowano radioizotopowo i rozdzielano metod 2D-E w cz ciowo-denaturuj cych elach PAA. Dwa przykładowe autoradiogramy przedstawione zostały na Rys. V.5.



Rysunek V.5. Dwa przykładowe autoradiogramy uzyskane w wyniku rozdziału frakcji RNA<120 metod 2D-E. Poddane analizie frakcje RNA<120 izolowane były z li ci *A. thaliana* (opis w tek cie). Obraz uzyskano za pomoc aparatu do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo.

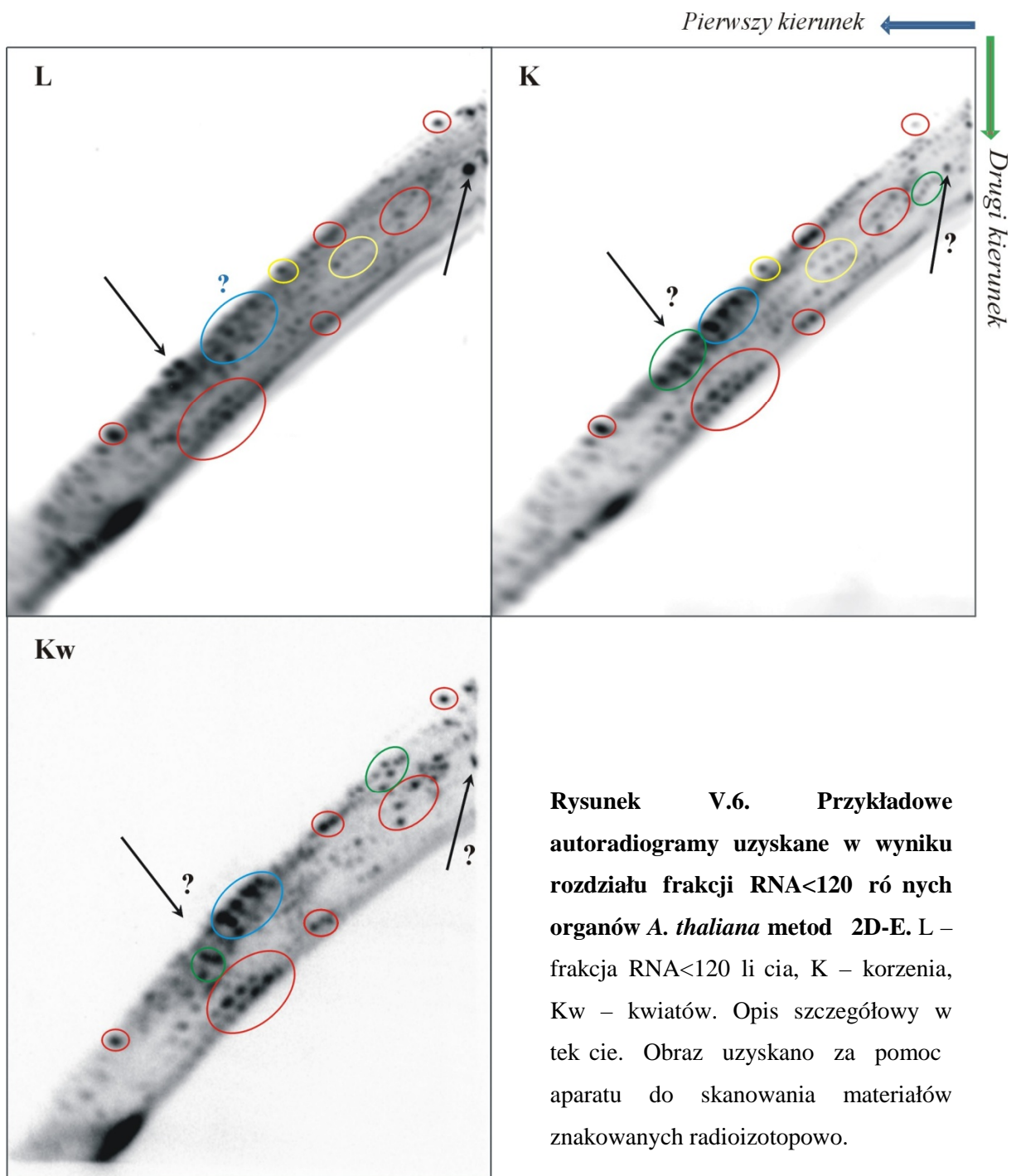
Porównanie uzyskanych autoradiogramów pozwoliło stwierdzić, iż wykazują one bardzo wysoki stopień podobieństwa. Oznacza to, że zastosowana procedura prowadziła bezpośrednio do izolacji podobnej puli cząsteczek RNA. Na podstawie poczynionych obserwacji można było postawić hipotezę, iż skład ilościowy oraz jakościowy frakcji RNA<120 jest cechą charakterystyczną dla danego typu komórek lub dla danej tkanki.

V.1.2.3 Analiza frakcji krótkich RNA z różnych organów *A. thaliana*

Aby zweryfikować powyższe hipotezy, analogiczne analizy metodą 2D-E przeprowadzono dla preparatów RNA<120 izolowanych z liści, korzeni oraz kwiatów roślin *A. thaliana*. Reprezentatywne autoradiogramy porównane zostały na Rys. V.6.

Nawet bardzo pobieżna analiza uzyskanych autoradiogramów pozwala stwierdzić, iż różni się one zarówno pod względem ilościowym (poziomym akumulacji poszczególnych cząsteczek), jak i jakościowym (zidentyfikowano cząsteczki charakterystyczne dla poszczególnych izolatów - na Rys. V.6.L, K i Kw oznaczone strzałką oraz zielonym okręgiem). Na przykład, na autoradiogramie uzyskanym dla preparatu pochodzącego z kwiatów zaobserwowano brak cząstek plam, obecnych w preparatach pozyskanych z liści i korzeni (fragment autoradiogramu oznaczony na Rys. V.6L i K. żółtym okręgiem). Natomiast w przypadku preparatów pochodzących z korzeni i kwiatów zaobserwowano pewne podobieństwo w usytuowaniu plam rodkowego rejonu autoradiogramu (Rys. V.6K i Kw - fragment oznaczony niebieskim okręgiem). W przypadku preparatu izolowanego z korzeni i kwiatów brak również dwóch plam ułożonych w rejonie rodkowym autoradiogramu bardzo charakterystycznych dla preparatu liściowego (na Rys. V.6L, K i Kw wskazane strzałką).

Przedstawiona powyżej analiza porównawcza preparatów RNA<120 izolowanych z różnych organów *A. thaliana* pozwala stwierdzić, iż w przypadku każdego z nich można zidentyfikować mniejszą lub większą grupę cząsteczek wykazujących specyficzną poziomą akumulację zarówno pod względem ilościowym lub jakościowym. Można zatem stwierdzić, iż preparaty RNA<120 wykazują specyficzną tkankową lub komórkową.



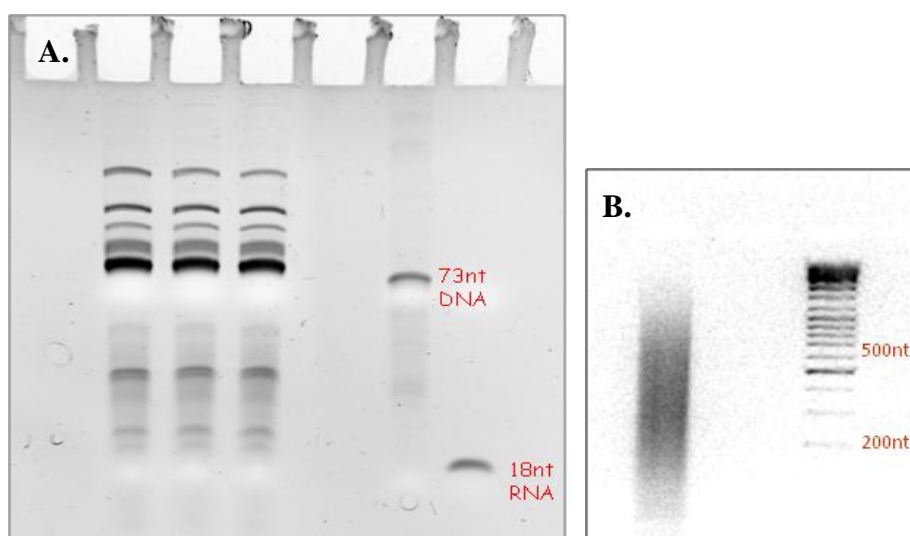
V.1.3. Analiza jakościowa frakcji krótkich RNA z liścia *A. thaliana*

Przeprowadzone analizy preparatów RNA_{<120} wykazały, iż są one tkankowo- lub komórkowo-specyficzne. Nie dowodzi to jednak, iż za obserwowane różnice odpowiedzialne są cząsteczki RNA będące produktami degradacji. Aby ustalić, jakiego typu cząsteczki obserwujemy na uzyskanych autoradiogramach postanowiono skonstruować dwie biblioteki

cDNA. Pierwsza nazwana bibliotek pełn (biblioteka RNA18-73) skonstruowana została na bazie cz steczek zawartych w preparacie RNA<120 izolowanym z li ci. Druga nazwana bibliotek cz steczek wyselekcjonowanych (biblioteka RNA70) zawierała jedynie 70 cz steczek, które w preparacie RNA<120 z li ci, wyst powały w najwy szym st eniu. Wyizolowano je wycinaj c fragmenty elu zawieraj ce plamki o najwy szej intensywno ci.

V.1.3.1 Konstrukcja biblioteki RNA18-73

Eksperyment maj cy na celu uzyskanie biblioteki RNA12-73 przeprowadzony został w dwóch fazach. W ka dej z nich zastosowano nieco inn metod klonowania cz steczek RNA. W przypadku pierwszej poszczególne etapy konstruowania biblioteki obejmowały: przył czenie oligomerów o zaprojektowanej sekwencji do ko ców 3' i 5' cz steczek RNA, odwrotn transkrypcj , amplifikacj metod PCR, trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym, ł czenie strawionych DNA w długie ł a cuchy (konkatamery), ligacj do wektora plazmidowego, transformacj bakterii i sekwencjonowanie pojedynczych klonów (Metody IV.7.). Produkty amplifikacji cDNA metod PCR oraz ligacji w konkatamery analizowano metod elektroforezy w 2% elu agarozowym (Rys. V.7B).



Rysunek V.7. Elektroforegram uzyskany w wyniku rozdziału totalnego RNA w 10% elu PAA (A). Wycinano frakcj RNA w oparciu o markery wielko ci. RNA oczyszczony z elu posłu ył jako matryca do konstrukcji biblioteki RNA18-73.

Elektroforegram uzyskany w wyniku rozdziału konkatamerów cDNA w 2% elu (niskotopliwa agaroz) (B).

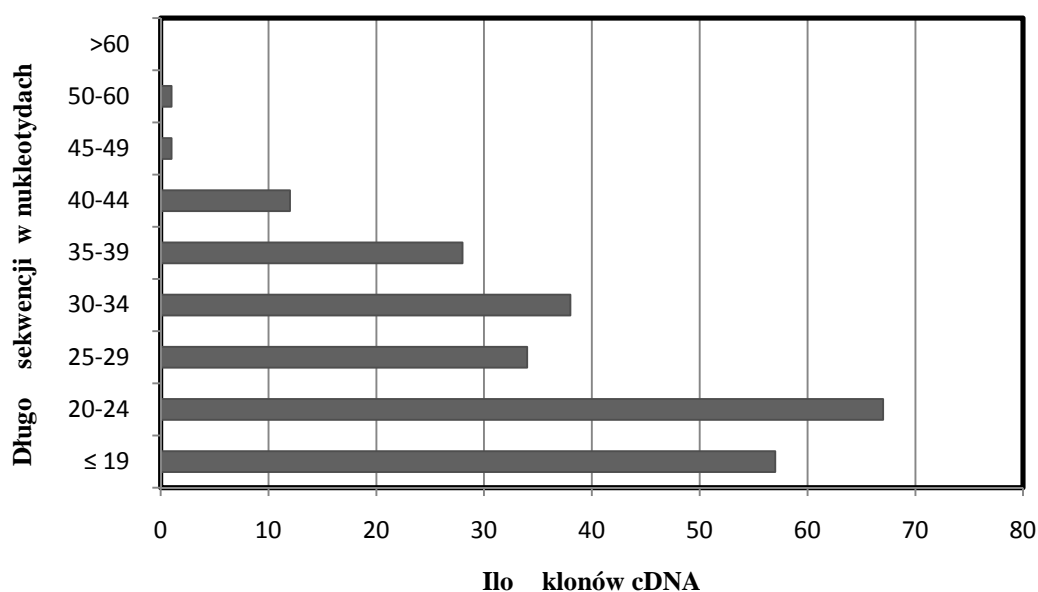
W wyniku pierwszego eksperymentu uzyskano 80 niezależnych klonów cDNA. Po ich przesekwencjonowaniu okazało się, że zidentyfikowane cząsteczki podzielić można na 62 grupy, w ramach których występuje od 1 do 5 różnych wariantów. W obrębie danej grupy cząsteczki różniły się długością od 1 do 20nt, w rzadkich przypadkach, jednonukleotydowych substytucji, insercji lub delecji.

Większość ogólnie dostępnych protokołów klonowania małych RNA zakłada konieczność przyłączenia syntetycznych oligomerów do obu końców cząsteczek RNA. W rezultacie, w kolejnych etapach eksperymentu, przepisaniu na cDNA ulegają wyłącznie cząsteczki posiadające monofosforan na końcu 5', w tym np. miRNA. Istnieje więc ryzyko, że cząsteczki pozbawione grupy monofosforanowej na końcu 5' nie zostaną zamplifikowane i sklonowane. Aby wykluczyć taką sytuację, w kolejnym etapie badań, zdecydowano się zmodyfikować protokół przygotowywania bibliotek RNA12-73. Pominięto reakcję przyłączenia oligomeru 5' End Acceptor Oligo, dzięki czemu możliwe stało się klonowanie cząsteczek bez względu na obecność lub brak reszty fosforanowej na końcu 5'.

Alternatywny protokół klonowania krótkich RNA (Metody IV.7.4) bazuje na specyficznej aktywności odwrotnej transkryptazy SSII (Invitrogen), która po przepisaniu cząsteczki RNA, dodaje kilka reszt cytozynowych na końcu 3' nowopowstałego cDNA. Łańcuch poli(C) wykorzystywany jest następnie jako miejsce hybrydyzacji jednego ze starterów i umożliwia syntezę drugiej nici DNA na matrycy cDNA. Pozostałe etapy klonowania cDNA przebiegały tak samo jak we wcześniej stosowanym protokole (Metody IV.7.). W rezultacie poddano analizie blisko 300 niezależnych klonów, uzyskując 116 niezależnych cząsteczek lub grup cząsteczek.

Na pełen obraz biblioteki RNA18-73 złożyły się wyniki obu eksperymentów klonowania krótkich RNA. Sumarycznie zidentyfikowano 161 niezależnych cząsteczek lub grup cząsteczek. Grupy te zawierały do 8 wariantów danej cząsteczki różniących się długością (od 1 do 28nt) lub pojedynczych substytucji, insercji lub delecji. Ponad 75% cząsteczek występowało wyłącznie w jednym wariantie długości.

Wszystkie cząsteczki zidentyfikowane w obrębie biblioteki RNA12-73 zawierają się w przedziale wielkości od 15 do 53 nt (Rys. V.8.). Najbardziej reprezentowane były cząsteczki o długości 20-24 nt. Do licznej różnorodnej grupy stanowi również cząsteczki kilkunastonukleotydowe oraz te, z przedziału 30-34 nt. Cząsteczki dłuższe niż 45 nt występowały niezwykle rzadko. Wszystkie zidentyfikowane cząsteczki przedstawione zostały w Tabelach X.1-7.

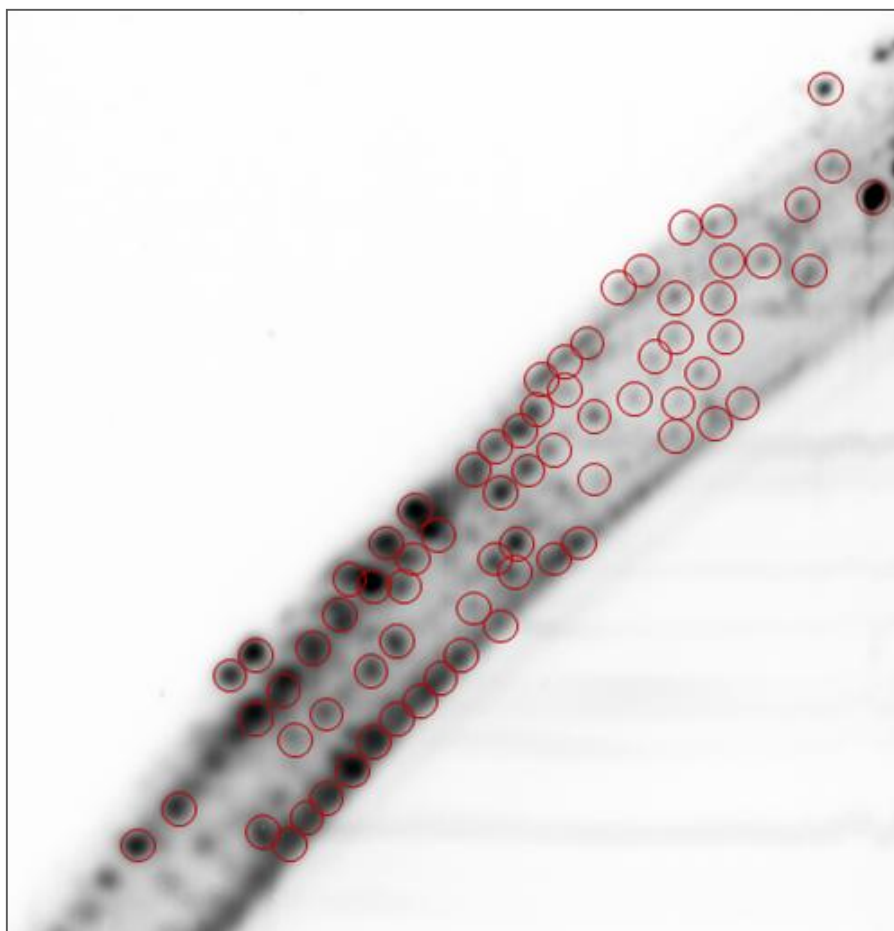


Rysunek V.8. Rozkład wielkości czeczek zidentyfikowanych w bibliotece RNA12-73 (uwzględniono wszystkie warianty długości czeczek).

V.1.3.2 Uzyskanie biblioteki RNA70

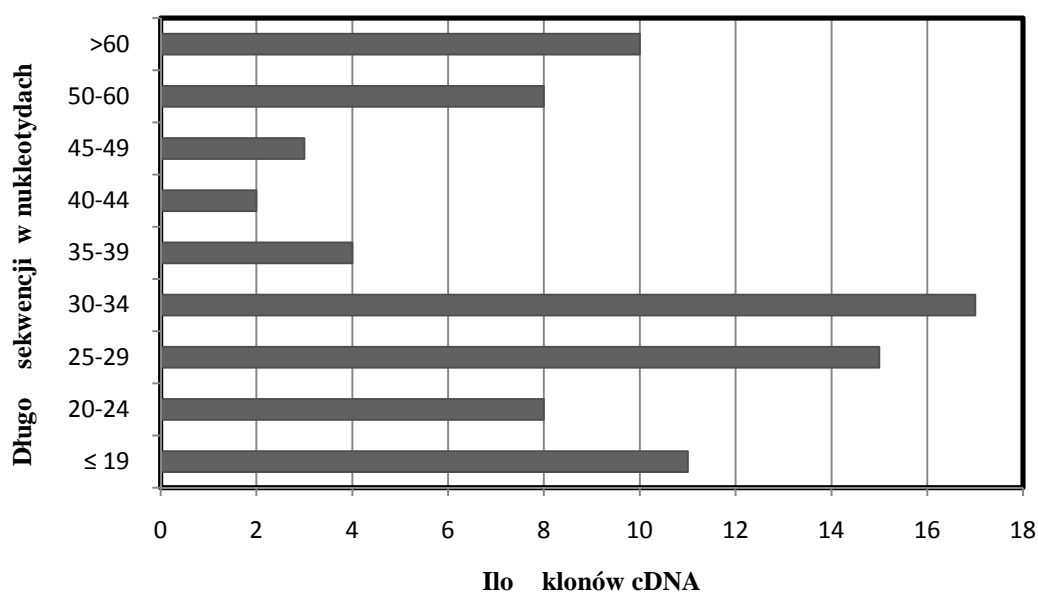
W celu uzyskania biblioteki RNA70 przeprowadzono standardową dwukierunkową elektroforezę preparatów RNA <120 izolowanych z liści *A. thaliana* (Metody IV.3). Otrzymany z wykorzystaniem autoradiografii obraz rozdzielający nastąpił do wytypowania 70 plam charakteryzujących się największą intensywnością (Rys. V.9). Wycięte zawierające je fragmenty elu i wyizolowano z nich RNA. Otrzymane w ten sposób czeczki posłużyły jako matryce do przygotowania biblioteki RNA70.

Przeprowadzono dwa eksperymenty klonowania czeczek RNA (Metody IV.7). W pierwszym wykorzystano czeczki wyizolowane z dwóch eli PAA, w kolejnym z czterech. Z każdym razem wycinano z elu te same plamy. W obu eksperymentach pominięto reakcję przyłączania oligomeru 5' End Acceptor Oligo. W zamian zastosowano odwrotną transkryptazę dodając ogon poliC na końcu 3' nowosyntetyzowanej nici.



Rysunek V.9. Autoradiogram uzyskany w wyniku rozdziału preparatu RNA<120 metod 2D-E. RNA izolowano z li ci *A. thaliana*; czerwonymi okr gami oznaczono plamy, z których pozyskano RNA do konstrukcji biblioteki RNA70 (opis w tek cie). Obraz uzyskano za pomoc aparatu do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo.

W rezultacie klonowania cDNA, a nast pnie sekwencjonowania około 500 plazmidów wyizolowanych z indywidualnych koloni, zidentyfikowano 66 niezale nych cz steczek. Dziewi z nich tworzyło grupy zawieraj ce kilka wariantów cz steczek o ró nej długo ci.. Najkrótsza z uzyskanych cz steczek składała si z 17 nukleotydów a najdłu sza z 118. Najbardziej ró norodn i najobficiej reprezentowan grup stanowiły cz steczki z przedziału 25-34 nt. Najmniej liczn cz steczki 35-49 nt (Rys. V.10). 55% cz steczek biblioteki RNA70 wyst powało równocze nie w bibliotece RNA18-73. Wszystkie zidentyfikowane cz steczki przedstawione zostały w Tabelach X.1-7.



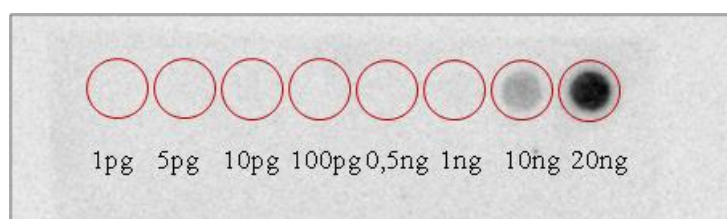
Rysunek V.10 Rozkład wielkości czeczek tworzących bibliotekę RNA70 (uwzględniono wszystkie warianty długości czeczek).

V.1.3.3 Identyfikacja pojedynczych czeczek z frakcji krótkich RNA

Analiza biblioteki RNA70 doprowadziła do zidentyfikowania 66 różnych czeczek. Aby ustalić, którym plamom na autoradiogramie odpowiadają poszczególne czeczki, postanowiono zastosować metodę hybrydyzacji typu dot blot (Metody IV.9).

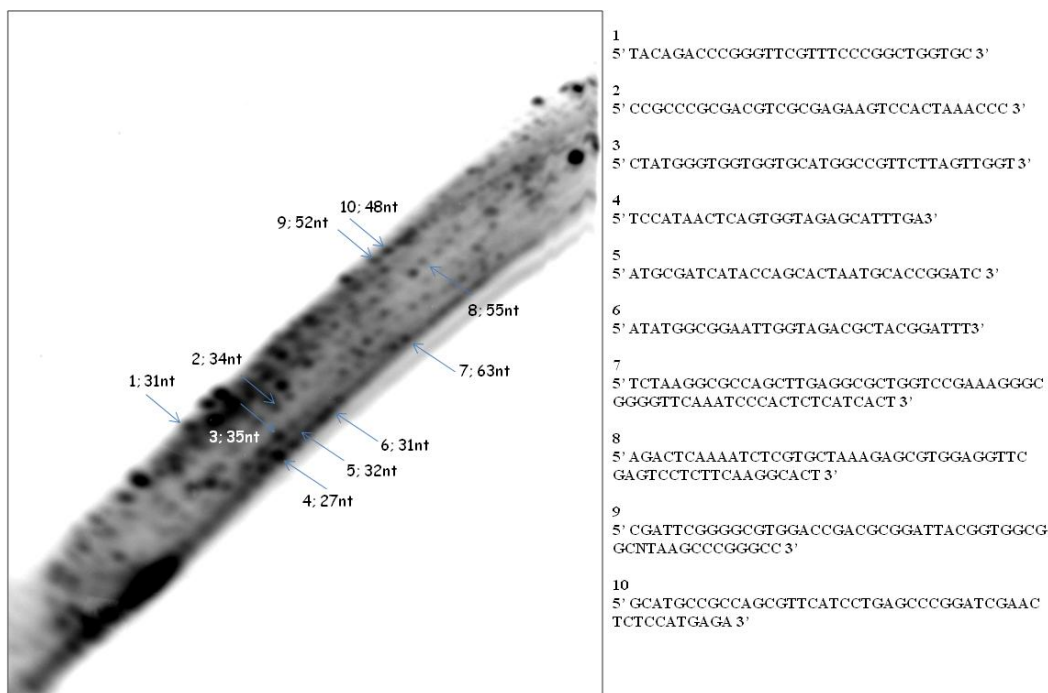
Ponownie przeprowadzono standardową dwukierunkową elektroforezę preparatów RNA <120 izolowanych z liści *A. thaliana* (Metody IV.3). Na otrzymanym autoradiogramie zidentyfikowano 70 tych samych co uprzednio plam charakteryzujących się największą intensywnością. Wycięte zawierające je fragmenty eluizacji z każdego indywidualnie wyizolowanego RNA. Otrzymane w ten sposób czeczki naniesiono w znanej kolejności na filtr nylonowy. Odczytano poziom radioaktywności, jak emitują poszczególne czeczki immobilizowane na membranie. Następnie hybrydyzowano z nimi znakowane radioizotopowo sondy DNA o sekwencji komplementarnej do czeczek najczęściej występujących w bibliotece RNA70 (Materiały III.5). Po zakończeniu hybrydyzacji ponownie odczytano poziom radioaktywności. Niestety nie stwierdzono żadnych istotnych zmian wiadczących o związaniu sond z naniesionymi na membranę czeczkami RNA. Eksperyment powtórzono kilkakrotnie zmieniając zarówno temperaturę jak i czas hybrydyzacji, nie uzyskano jednak zadowalającego wyniku.

Zastosowana metoda hybrydyzacji typu dot blot okazała si nie skuteczna najprawdopodobniej ze wzgl du na zbyt mała ilo materiału wyj ciowego naniesionego na membran (RNA po elucji z elu PAA). Opini t potwierdzaj wyniki hybrydyzacji testowej, w której wykorzystano zaprojektowan cz steczk DNA o sekwencji komplementarnej do jednej ze stosowanych wcze niej sond (Materiały III.5). Nieznakowany DNA nanoszono na filtr nylonowy w 8 ró nych st eniach od 1 pg do 20 ng i hybrydyzowano ze znakowan w pełni komplementarn sond . Analiza uzyskanego autoradiogramu pozwoliła stwierdzi , e wykrywalna za pomoc aparatu do skanowania materiałów znakowanych radioizotopowo ilo sondy zwi zała si jedynie w miejscach, w których naniesiono DNA o st eniu 10 ng i 20 ng (Rys. V.11). W pozostałych przypadkach st enie zwi zanego z filtrem DNA było zbyt niskie, aby wi za daj c si wykry ilo znakowanej radioizotopowo sondy.



Rysunek V.11. Eksperyment testowy – hybrydyzacja typu dot blot; nieznakowany DNA naniesiono na filtr w 8 ró nych st e a nast pnie hybrydyzowano ze znakowan radioaktywnie komplementarn sond ; sygnał hybrydyzacji z sond widoczny był jedynie w miejscach, w których naniesiono DNA o st eniu 10 ng i 20 ng.

Niepowodzenie przedstawionego powy ej do wiadczenia sprawiło, i podj to prób klonowania indywidualnych cz steczek RNA tworz ych bibliotek RNA70. W tym celu izolowano z elu pojedyncze cz steczki RNA, nie ł czono ich, lecz ka d osobno klonowano. Poszczególne etapy klonowania obejmowały: dodanie ła cucha poliA do ko ca 3' cz steczki, odwrotn transkrypcj , amplifikacj , ci cie enzymami restrykcyjnymi, wł czanie do wektora plazmidowego, transformacj bakterii i sekwencjonowanie wyselekcjonowanych klonów (Metody IV.8). Naley zaznaczy , i aby opracowa t metod zastosowano modelow 24 nt cz steczk RNA o st eniu wyj ciowym 0,5 ng/ μ l. W wyniku przeprowadzonych do wiadcze zidentyfikowano cz steczki RNA pochodz ce z 10 plam (Rys. V.12). Kilkakrotnie ponawiano prób poznania sekwencji cz steczek RNA wyizolowanych z pozostałych plam. Pomimo, i w jednym eksperymencie wykorzystywano RNA izolowany z dwóch eli PAA nie udało si osi gn zamierzonego celu.



Rysunek V.12. Autoradiogram uzyskany w wyniku rozdziału preparatu RNA<120 metod 2D-E. RNA izolowano z liści *A. thaliana*; strzałkami wskazano plamy odpowiadające 10 zidentyfikowanym cząsteczkom RNA. Plamy ponumerowano od 1 do 10, obok nr podano długość cząsteczki.

Indywidualne klonowanie RNA wyizolowanych z wyselekcjonowanych plam pozwoliło oszacować wielkość cząsteczek występujących w poszczególnych rejonach elu. Okazało się, że rejon środkowy o największym zagęszczeniu plam obejmuje cząsteczki o wielkości 27-34 nt, natomiast na 2/3 wysokości elu występują cząsteczki 48-63 nt. Interesujący wydaje się fakt, że nie zawsze cząsteczki rozpoznane jako dłuższe zlokalizowane są odpowiednio wyżej od cząsteczek krótszych. Widano to na przykładzie cząsteczki nr 10, która charakteryzowała się wolniejszą migracją niż wiksza od niej cząsteczka nr 9. Podobnie, cząsteczka nr 7, o długości 63 nt, znajdowała się zdecydowanie poniżej krótszych cząsteczek o numerach: 8, 9 i 10. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że w trakcie dwukierunkowej elektroforezy stosunkowo krótkich RNA w warunkach częściowej denaturacji, migracja cząsteczek zależy nie tylko od ich długości, ale również od masy i struktury.

V.1.4. Analiza bioinformatyczna degradomu RNA

Aby stwierdzić, jak często sklonowanych cząstek zaliczyć można do produktów degradacji wiązanych funkcjonalnych RNA, przeprowadzono szczegółową analizę wszystkich zidentyfikowanych molekuł.

V.1.4.1 Wstępna analiza składu degradomu

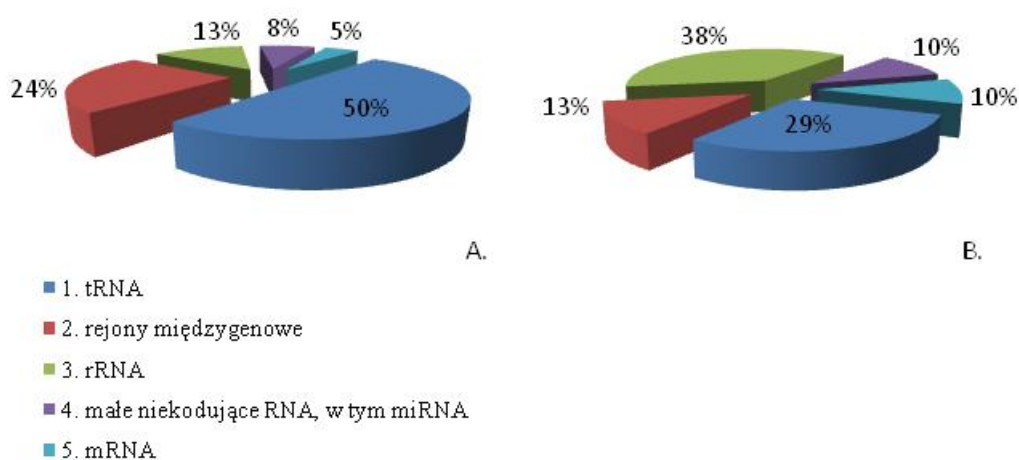
Analiza bioinformatyczna (przy użyciu programu BLAST) cząstek biblioteki RNA18-73 wykazała, że 98% (157 z 161 zidentyfikowanych) z nich można zakwalifikować jako produkty degradacji. Spośród produktów degradacji 35% molekuł powstało z rozpadu tRNA, 30% pochodziło z cząstek rRNA, 9% to fragmenty znanych cząstek mRNA, a 18% odpowiadało niescharakteryzowanym jeszcze transkryptom, pochodzącym z rejonów międzygenowych. Pozostałe 8% sekwencji biblioteki RNA18-73 odpowiadało cząstkom związanym z biogenezą małych niekodujących RNA (z analizy wykluczono 4 cząstki odpowiadające znanym mikroRNA i tasiRNA) (Tab. V.1).

Okazało się, że i w przypadku biblioteki RNA70 wiązanych zidentyfikowanych cząstek to także produkty degradacji wiązanych transkryptomów (90%; 60 z 66 zidentyfikowanych). I tutaj najliczniejszą grupę stanowiły produkty degradacji tRNA 48% (z analizy wykluczono 6 cząstek tRNA pełnej długości). Pozostałe zidentyfikowane grupy tworzyły produkty degradacji rRNA 37%, mRNA 5% oraz RNA powstałe z niescharakteryzowanych transkryptomów rejonów międzygenowych 3% i cząstki związane z biogenezą małych niekodujących RNA 7%.

Tabela V.1. Procentowy udział różnego typu produktów degradacji w bibliotece RNA18-73 i RNA70.

Typ RNA	Udział w puli zidentyfikowanych cząstek biblioteki RNA18-73	Udział w puli zidentyfikowanych cząstek biblioteki RNA70
tRNA	35%	48%
rRNA	30%	37%
Rejony międzygenowe	18%	3%
Małe RNA	8%	7%
mRNA	9%	5%

Dysponując wynikami analizy bioinformatycznej biblioteki RNA18-73, porównano dwa sposoby klonowania krótkich RNA. W pierwszym podejściu, do obu końców cząsteczek RNA przyłączono krótkie oligomery. Drugie podejście pozwalało sklonować cząsteczki z pominięciem reakcji przyłączania oligomeru do końca 5' RNA. Stwierdzono, że w zależności od zastosowanej metody zmieniał się udział procentowy różnego typu degradantów (Rys. V.13). Połowa cząsteczek uzyskanych w trakcie pierwszego eksperymentu powstała z degradacji tRNA, 24% pochodziło z niescharakteryzowanych transkryptów rejonów mi dzygenowych, natomiast produkty degradacji rRNA stanowiły zaledwie 13% biblioteki. W przypadku drugiego eksperymentu udział produktów degradacji tRNA zmniejszył się do 29%, a cząsteczek rejonów mi dzygenowych do 13%. Metoda ta pozwoliła jednak efektywniej klonować cząsteczki pochodzące z degradacji rRNA, których udział w bibliotece osiągnął 38%. Pozostałe zidentyfikowane klasy: cząsteczki związane z biogenezą małych niekodujących RNA i mRNA stanowiły odpowiednio 8% i 5% w przypadku pierwszego eksperymentu oraz po 10% w przypadku drugiego. Na całkowity obraz biblioteki RNA18-73 złożyły się zsumowane wyniki obu eksperymentów.



Rysunek V.13. Porównanie udziału różnego typu degradantów zidentyfikowanych w pierwszym i drugim eksperymencie klonowania biblioteki RNA18-73. A – Eksperyment pierwszy, podczas którego przyłączono oligonukleotydy do obu końców cząsteczek RNA (Metody IV.7.3), B – Eksperyment drugi, w którym pominięto etap przyłączania oligomeru do końca 5' RNA (Metody IV.7.4).

V.1.4.2. Produkty degradacji rRNA

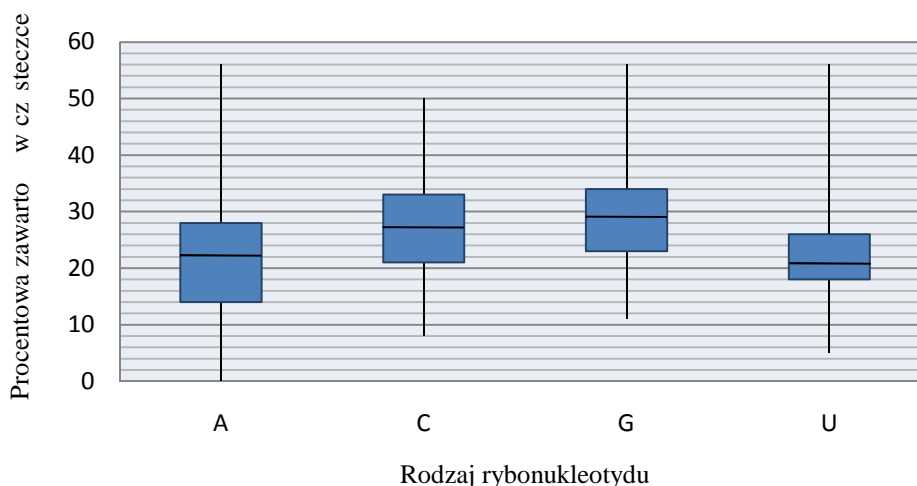
Szczegółowa analiza obu bibliotek wykazała, że produkty degradacji rRNA stanowi niezwykle różnorodny i ciekawy grupę cząsteček. Łącznie zidentyfikowano 57 klonów wykazujących homologie do znanych cząsteček rRNA *Arabidopsis thaliana*, w tym 47 obecnych było w bibliotece RNA18-73, a 22 w bibliotece RNA70 (12 występowało w obu bibliotekach) (Tabela X.1). Długość cząsteček z biblioteki RNA18-73 wynosiła od 15 do 51 nt, natomiast w przypadku biblioteki RNA70 mieściła się w granicach od 17 do 118 nt. Homologiczne cząstečki występowały jednocześnie w obu bibliotekach, bardzo często różniły się długością. Jednakże w każdym przypadku, klon zidentyfikowany w bibliotece RNA70 był najdłuższy w obrębie danej grupy. Można więc przypuszczać, że stanowił on swego rodzaju cząsteček prekursorów z której powstały krótsze warianty. Grupy zawierające największą liczbę homologicznych cząsteček o różnej długości tworzone były przez produkty degradacji 5S rRNA i 5,8S rRNA.

W przypadku większej liczby cząsteček udało się uzyskać tylko jeden klon cDNA. Były jednak i takie, których klony cDNA były otrzymywane wielokrotnie co świadczyć mogło, iż występowały one w analizowanych bibliotekach z większą częstością niż inne cząstečki. W przypadku degradantów tworzących biblioteki RNA18-73 uzyskano największą liczbę klonów 26 i 28 nt homologicznych fragmentów 5,8S rRNA (odpowiednio 12 i 19 niezależnych powtórzeń), 17 nt fragmentu 25S rRNA (11 niezależnych powtórzeń) oraz 19 nt fragmentu 18S rRNA (10 niezależnych powtórzeń). Ponieważ podczas konstruowania biblioteki RNA70, zebrane izolaty łączono w różnych proporcjach, tak by wszystkie cząstečki występowały w podobnych stężeniach stwierdzić nie było uzasadnienia dla przeprowadzenia analogicznej analizy ilościowej.

Źródłem największej liczby różnych produktów degradacji rRNA były cząstečki 25S rRNA i 18S rRNA. Degradanty te stanowiły odpowiednio 44% i 37% wszystkich zidentyfikowanych fragmentów rRNA w obu bibliotekach. Pozostałe cząstečki pochodziły z 5S rRNA i 23S rRNA, po 5%; 16S rRNA i 4,5S rRNA, po 3,5% oraz 5,8S rRNA, 2%. W przypadku 25S rRNA, a także 5S rRNA, przypisane im produkty degradacji pochodziły z rozpadu dwóch różnych funkcjonalnych izoform.

Analiza składu nukleotydowego tej frakcji degradatu RNA pozwoliła wyznaczyć mediany opisujące częstość występowania poszczególnych reszt. Wynosiły one odpowiednio: A 22%, U 21%, C 27%, i G 29%. Okazuje się zatem, że w sekwencjach badanych cząsteček nieco przeważa reszta GC (~56%) w stosunku do AU (~44%). Istnieją jednak przykłady cząsteček, w których procentowy udział jednej z reszt nukleotydowych wynosi ponad 50%

lub poniżej 10%. Czeczki, w których dominacja jednego nukleotydu sięga 50% i więcej to czeczki krótkie, 18-20 nt, podobnie jak te, ubogie w A. Natomiast czeczki o znikomej zawartości U pochodzą z przedziału wielkości 15-20 nt a także 24-34 nt. Nie zidentyfikowano czeczek o mniejszej niż 11% zawartości G, a tylko w przypadku jednej czeczki (o długości 24 nt) udział C był mniejszy niż 10%. Udział poszczególnych reszt nukleotydowych z uwzględnieniem wartości minimalnych i maksymalnych oraz mediany (wartości środkowej) przedstawiono na Rys. V.14.



Rysunek V.14. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów (A, C, G, U) w produktach degradacji rRNA. Podstawa i wierzchołek wskazują najniższą i najwyższą wartość. Polem niebieskim oznaczono rozstęp kwartylny czyli przedział zawierający połowę populacji czeczek; pogrubioną poziomą linię wskazano wartość mediany.

V.1.4.2.1. Inne potencjalne źródła czeczek zaklasyfikowanych jako produkty degradacji rRNA

Porównanie sekwencji degradantów z genomową sekwencją *A. thaliana* wykazało, że znaczna liczba czeczek zaklasyfikowanych jako produkty rozpadu rRNA, równie dobrze mogła pochodzić z innych czeczek. Program BLAST wyszukiwał dla tych degradantów więcej niż jeden transkrypt wykazujący porównywalny a najczęściej identyczny stopień dopasowania. Obok rRNA, prekursorem tych czeczek mogły być mRNA oraz w przypadku krótkich czeczek, małe RNA o niepoznanej funkcji. W przypadku produktów degradacji, dłuższych niż 30 nt, znaleziono wiele miejsc dopasowania do rejonów genu kodujących potencjalne miRNA (odpowiadały one jedynie fragmentowi analizowanych czeczek). Lista mRNA, które stanowią potencjalne źródło czeczek zaklasyfikowanych jako produkty degradacji rRNA została zamieszczona w Tab. V.2.

Tabela V.2. Cz steczki rRNA oraz mRNA, z których mogły powsta niektóre ze zidentyfikowanych produktów degradacji. Dodatkowo w tabeli podano cz sto z jak identyfikowana była dana cz steczka oraz w nawiasie liczba zidentyfikowanych wariantów.

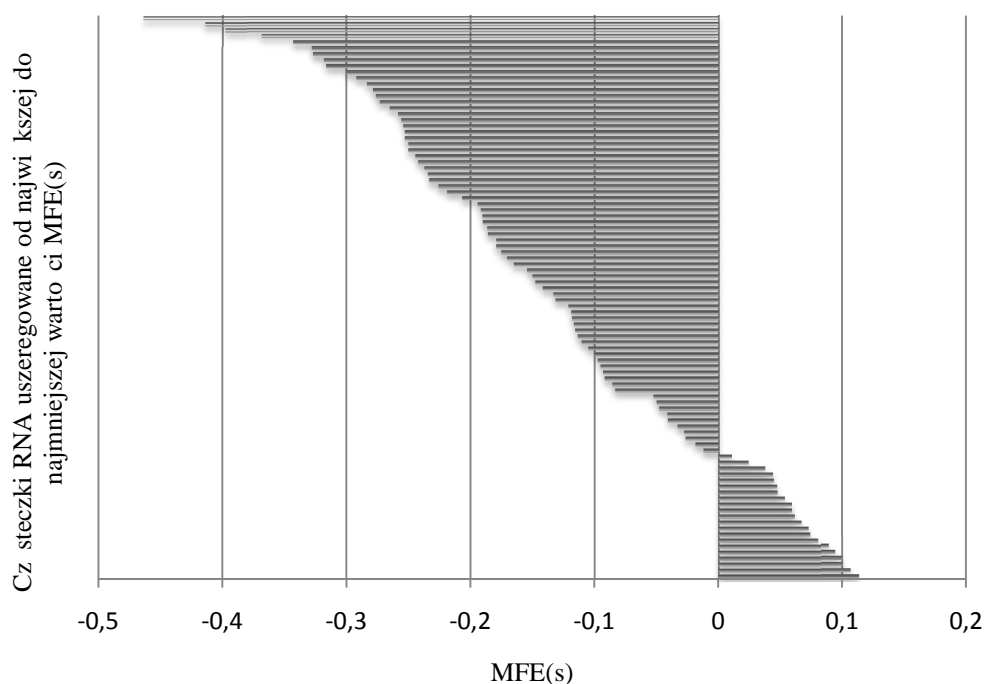
Numer cz steczki*	rRNA	mRNA	Cz sto identyfikacji (liczba wariantów)
10, 16, 20, 24	25S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, locus: BX821808	4
2	25S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 2 (At2G01021)	1(3)
3-5, 7-9, 11-15, 17-18, 21-23, 25	25S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 3 (At3g41950)	17 (22)
12, 14, 19, 23	25S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 3 (At3g41970)	4(5)
1, 6	25S rRNA	mRNA białka z rodziny metalotionein, chromosom 1 (At1g07600)	2 (5)
26-46	18S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 2 (At2g16590/F1P15.3)	21 (26)
50	23S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 2 (At2g07707)	1
51	23S rRNA	mRNA czynnika transkrypcyjnego i czynnika naprawy DNA (XPB2); locus AY550923	1
54	16S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 2 (At2G07777)	1 (2)
55	5,8S rRNA	mRNA hipotetycznego białka, chromosom 2; locus AK226265	1 (7)
56-57	4,5S rRNA	mRNA syntetazy glutationu (gsh2), locus ATU53856	2 (4)

* Numer cz steczki odnosi si do pozycji w Tabeli VIII.1.

V.1.4.2.2. Analiza strukturalna

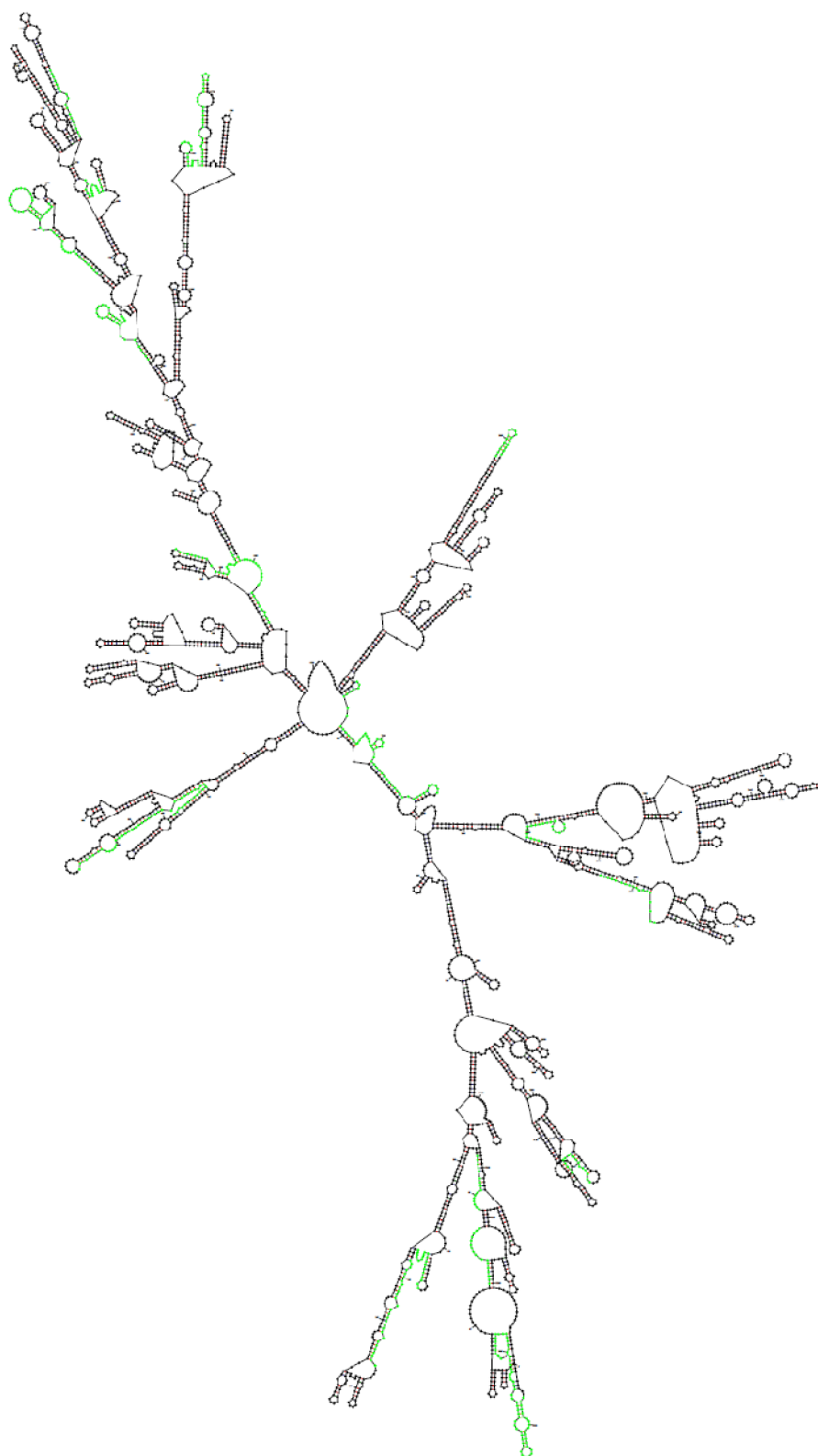
Aby okre li stabilno termodynamiczn zidentyfikowanych produktów degradacji wykorzystano program MFOLD przewiduj cy struktur drugorz dow RNA (Zuker, 2003). W przypadku ka dej cz steczki wybrano tylko jeden z wygenerowanych modeli, ten, charakteryzuj cy si najmniejsz energii swobodn . Nast pnie chc c je porówna posłu ono si współczynnikiem MFE(s) (ang. *minimum free energy/sequence*, Loong i Mishra; 2006) charakteryzuj cym wzgl dn energii swobodn cz steczki. Ze wzgl du na ró n długo produktów degradacji porównanie wielko ci bezwzgl dnych byłoby pozbawione sensu. Współczynnik MFE(s) został zdefiniowany jako iloraz energii swobodnej i długo ci danej cz steczki podanej w nukleotydach. Z przeprowadzonych analiz wynika, e dla połowy produktów degradacji rRNA współczynnik MFE(s) zawiera si w przedziale od -0,1 do -0,3.

Zanotowano również niewielką frakcję cz. steczek dla których MFE(s) wynosi mniej niż $-0,3$ kcal/nt (Rys. V.15).



Rysunek V.15. Rozkład współczynnika MFE(s) dla cz. steczek RNA zidentyfikowanych jako produkty degradacji rRNA; analiz obj to cz. steczki obu biblioteki cDNA.

Dodatkowo sprawdzono w jakich rejonach cz. steczek rRNA ulokowane są zidentyfikowane produkty degradacji. W tym celu, z zestawu prawdopodobnych struktur drugorzędowych rRNA wygenerowanych za pomocą programu MFOLD wybrano te o minimalnej energii swobodnej a następnie zidentyfikowano rejony, w których położone są degradanty. Z przeprowadzonej analizy wynika, że cz. produktów degradacji rRNA powstała mogła na skutek odcięcia pętli apikalnych, natomiast inne mogły pochodzić z długich odcinków dwuniciowych. Szczególnie interesujący wydaje się drugi sposób uwalniania analizowanych produktów degradacji, ze względu na podobieństwo do procesu biogenezy małych regulatorowych RNA, np. miRNA. Usytuowanie poszczególnych degradantów w obrębie rRNA przedstawiono na przykładzie 25S RNA (Rys. V.16).



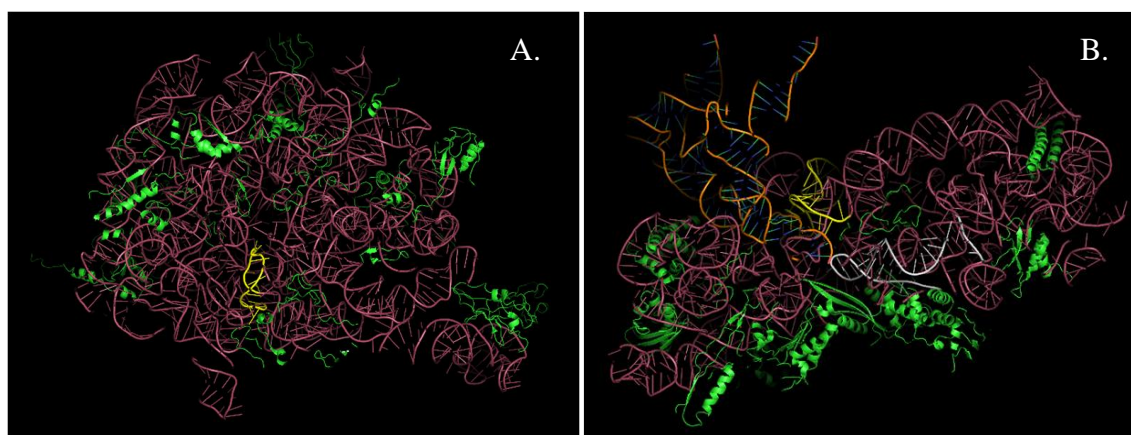
Rysunek V.16. Struktura drugorzędkowa 25S rRNA wygenerowana z wykorzystaniem programu MFOLD (Zuker, 2003). Kolorem zielonym oznaczono fragmenty odpowiadające produktom degradacji; w przypadku zidentyfikowania wariantów różniących się długością, uwzględniono czynniki sterujące najdłuższymi.

W kolejnym etapie bada ustalono w jaki sposób produkty degradacji rRNA usytuowane s w obr bie rybosomu. Poniewa struktura krystaliczna ro linnych rybosomów nie została jak dot d poznana, a dost pne hipotetyczne modele pozbawione s szczegółowych informacji, posłu ono si znan trójwymiarow struktur rybosomu bakteryjnego z organizmu *Thermus thermophilus* (Selmer 2006). Spo ród wszystkich zidentyfikowanych produktów degradacji organellowych rRNA *Arabidopsis*, trzy wykazały du y stopie podobie stwa do prokariotycznych rRNA. Były to dwie cz steczki pochodz ce z 16S rRNA małej podjednostki oraz jedna cz steczka z 23S rRNA du ej podjednostki rybosomu (Tab. V.3).

Tabela V.3. Degradanty wykazuj ce podobie stwo do rRNA *Thermus thermophilus*; kolorem wyszczególniono pozycje ró ni ce sekwencj ro linn od bakteryjnej.

rRNA	Sekwencja analizowanej cz steczki
23S rRNA	5' GACTGTTTACCAAAAA 3'
16S rRNA	5' TCTCATGGAGAGTTCGATCCGGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGC 3'
16S rRNA	5' TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT 3'

Wszystkie trzy produkty degradacji zostały zlokalizowane w modelu struktury przestrzennej rybosomu bakteryjnego (Rys. V.17).



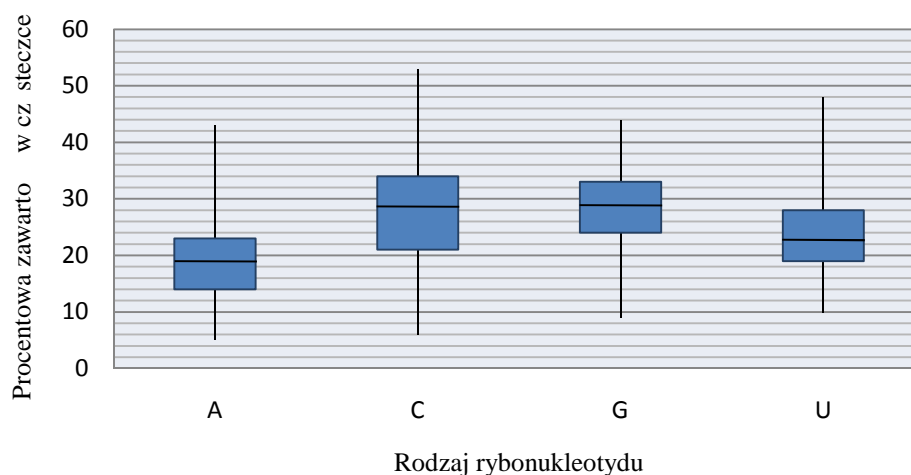
Rysunek V.17. Trójwymiarowy model struktury du ej (A) i małej (B) podjednostki rybosomu prokariotycznego *Thermus thermophilus* (Selmer 2006); kolorem zielonym oznaczono białka, kolorem łososiowym rRNA, dwie cz steczki tRNA oddziałuj ce z mał podjednostk rybosomu przedstawiono w kolorach: pomara czowym i niebieskim. Na rysunku (A) ółtym kolorem wskazano lokalizacj produktu degradacji 23S rRNA; na rysunku (B) wskazano lokalizacj obu produktów degradacji 16S rRNA: ółtym kolorem fragment le cy przy ko cu 3', szarym kolorem fragment usytuowany przy ko cu 5' 16S rRNA.

Fragment pochodzący z 23S rRNA obejmuje reszty nukleotydowe 1770-1785, licząc od końca 5', 2898 nt czeczek 23S rRNA. Natomiast dwa fragmenty pochodzące z 16S rRNA zlokalizowane są przy obu końcach i obejmują pozycje 5-48 oraz 1490-1531. Z poczynionych obserwacji wynika, że wszystkie analizowane rejony rRNA położone są w pobliżu centrum biosyntezy białka, w okolicy płaszczyzny wzajemnego oddziaływania obu podjednostek (Rys. V.17).

V.1.4.3. Produkty degradacji tRNA

Spśród wszystkich czeczek zidentyfikowanych w obrębie obu bibliotek najliczniejszą frakcję stanowi te, zaklasyfikowane jako produkty degradacji tRNA. Łącznie zidentyfikowano 73 klonów wykazujące homologie do znanych czeczek tRNA. Ponieważ 6 okazało się być pełnej długości czeczkami tRNA wykluczono je z dalszych analiz. W sumie objęły one 67 sklonowanych degradantów. Wikszość z nich (49 czeczek) to produkty rozpadu tRNA kodowanych przez genom jądrowy *A. thaliana*, kolejnych 18 powstało z organelowych tRNA, w tym jeden najprawdopodobniej z tRNA mitochondrialnego. W przypadku produktów degradacji tRNA cytoplazmatycznych, 40 klonów wyizolowano z biblioteki RNA18-73, 21 z biblioteki RNA70. Z jednym tylko wyjątkiem, wszystkie czeczki zaklasyfikowane jako produkty degradacji tRNA organelowych występowały w bibliotece RNA18-73, natomiast w bibliotece RNA70 zidentyfikowano 9 czeczek pochodzenia plastydowego. Długość poszczególnych degradantów wynosiła od 17 do 53 nt (po wykluczeniu z analizy 6 czeczek tRNA pełnej długości), przy czym 30 klonów tworzyło grupy wariantów różniących się długością. Grupy z największą liczbą wariantów powstały w rezultacie rozpadu tRNA glicynowego i tryptofanowego.

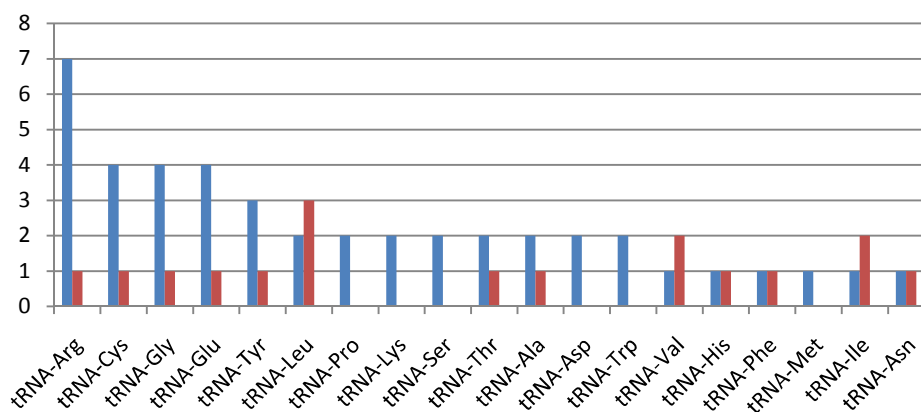
Analiza składu nukleotydowego czeczek tworzących tę frakcję degradatu RNA pozwoliła wyznaczyć mediany opisujące występowanie poszczególnych reszt: A 19%, U 23%, C i G po 29%. Okazuje się zatem, że w sekwencjach zidentyfikowanych czeczek przeważają reszty GC (~58%). Istniały jednak czeczki, w których procentowy udział jednej z reszt nukleotydowych wynosił ponad 40% lub poniżej 10% (Rys. V.18). Nie stwierdzono by istniał związek pomiędzy składem nukleotydowym a długością analizowanych czeczek.



Rysunek V.18. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów (A, C, G, U) w produktach degradacji tRNA. Podstawa i wierzchołek wskazują najniższą i najwyższą wartość. Polem niebieskim oznaczono rozstęp kwartylny, czyli przedział zawierający połowę populacji cz. steczek; pogrubioną poziomą linię wskazano wartość mediany.

Wszystkie zidentyfikowane cz. steczki to produkty degradacji 19 typów tRNA cytoplazmatycznych oraz 13 organelowych. Spośród cytoplazmatycznych tRNA 50% kodowanych jest przez geny znajdujące się na chromosomie 5, 23% na chromosomie 2, natomiast tRNA pochodzące z pozostałych chromosomów stanowi odpowiednio: chromosom 1 - 11%, chromosom 3 - 9%, chromosom 4 - 7%.

Z przeprowadzonych analiz wynika, iż udział poszczególnych typów tRNA w generowaniu stabilnych produktów po rednych degradacji nie jest jednakowy (Rys. V.19).



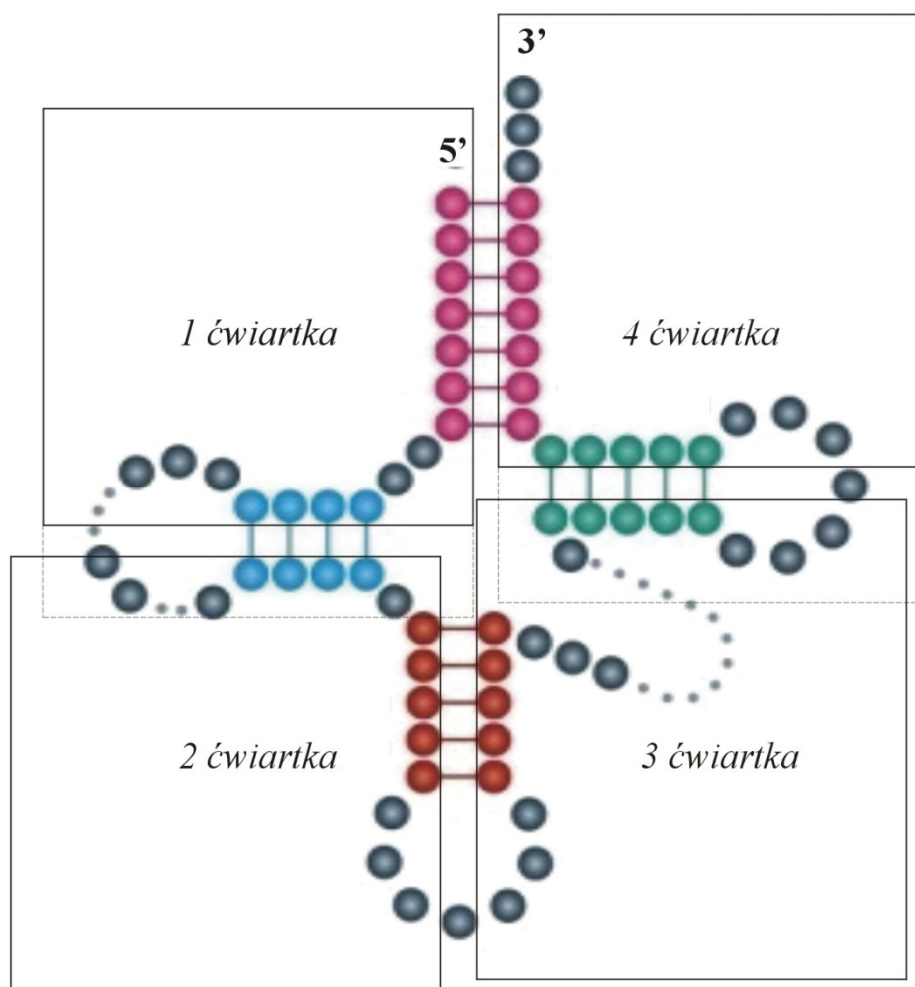
Rysunek V.19. Udział poszczególnych typów tRNA pochodzenia cytoplazmatycznego (kolor niebieski) i organelowego (kolor czerwony) w generowaniu produktów degradacji obu bibliotek.

A 7 różnych cytoplazmatycznych tRNA dekodujących arginin stanowiło źródło degradantów, podobnie 4 różne tRNA-Cys, -Gly oraz -Glu. Natomiast w przypadku tRNA-Val, -His, -Phe, -Met, -Ile oraz -Asn zidentyfikowano produkty degradacji tylko jednej czeczeki. W przypadku biblioteki RNA18-73 z największą czeczką klonowane były fragmenty tRNA-Gly (27 nt z tRNA-Gly/GCC i 28 nt z tRNA-Gly/CCC, po 7 niezależnych powtórzeniach) i tRNA-Trp/CCA (35 i 34 nt, odpowiednio 9 i 5 niezależnych powtórzeniach). Produkty degradacji tRNA-Gly i tRNA-Trp tworzyły równie grupy z największą liczbą wariantów różniących się długością.

W przypadku czeczek pochodzenia organellowego źródłem największej liczby degradantów były 3 różne tRNA-Leu, 2 -Ile i 2 -Val. Pojedyncze typy tRNA były prekursorami pozostałych zidentyfikowanych produktów degradacji. Jednakże dla szeregu typów tRNA organellowych (tRNA-Pro, -Lys, -Ser, -Asp, -Trp, i -Met) nie zidentyfikowano żadnego produktu degradacji (Rys. V.19).

Najprawdopodobniej ze względu na strukturę drugorzędową czeczek tRNA olbrzymia większość analizowanych produktów degradacji powstała na skutek zerwania wiązania fosfodiesterowego w rejonie jednoniciowym, najczęściej w płci antykodonowej (Rys. V.20). Biorąc pod uwagę obserwowany wzorzec, czeczki tRNA można było podzielić na cztery czeczki odpowiadające poszczególnym wiartkom: 1, 2, 3 i 4 (Rys. V.20).

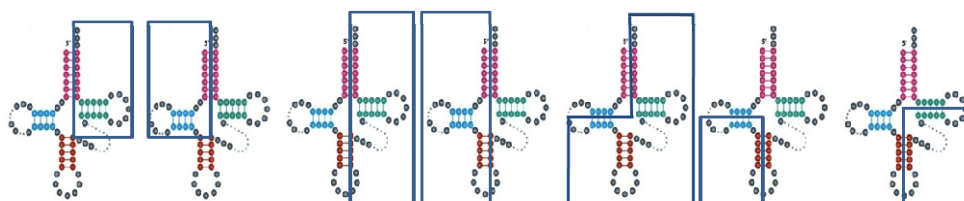
Hydrolizacja wiązania fosfodiesterowego w rejonie płci antykodonowej prowadzi do rozpadu czeczki tRNA na dwie podobnej długości czeczki. Akumulacja obu czeczek z tej samej czeczki obserwowano jednak zaledwie w przypadku 6 analizowanych tRNA (tRNA-Gly, 2 tRNA-Ala, 2 tRNA-Asp, chloroplastowy tRNA-Leu). Spośród wszystkich czeczek zaklasyfikowanych jako produkty degradacji tRNA najliczniejsze frakcje tworzyły czeczki odpowiadające 4 wiartce (powstałe w wyniku hydrolizy wiązania w płci ramienia T₁C oraz w rejonie ł czcym ramieniu T₁C i ramieniu antykodonu) oraz fragmenty odpowiadające czeczce 3'-kocowej (połowy obejmujące 3 i 4 wiartki). Pierwsze z nich stanowiły 39% degradantów cytoplazmatycznych i 50% organellowych, natomiast drugie to 35% degradantów powstałych z tRNA cytoplazmatycznych oraz 22% powstałych z tRNA organellowych. Bardzo interesujący wydaje się fakt, iż wszystkie analizowane produkty degradacji tRNA dekodujących arginin odpowiadały 3'-kocowej czeczce czeczek (5 czeczek stanowiło połowy obejmujące 3 i 4 wiartki, 2 czeczki odpowiadały 4 wiartce), podobnie w przypadku 4 z 5 tRNA-Leu oraz 4 z 5 tRNA-Glu.



Rysunek V.20. Wzór ci cia w rejonach jednoniciowych cz steczki tRNA. Produkty ci cia obecne w obu bibliotekach odpowiadały poszczególnym wiartkom: 1, 2, 3 i 4. Cz steczki odpowiadaj ce wiartce 1 powstały poprzez hydroliz wi zania w p tli ramienia T C lub na skutek zerwania wi zania internukleotydu w rejonie jednoniciowym ł cz cym rami T C i rami antykodonu; cz steczki odpowiadaj ce wiartce 2 – na skutek hydrolizy wi zania w p tli ramienia T C i p tli antykodonu; cz steczki odpowiadaj ce wiartce 3 – na skutek hydrolizy wi zania w p tli antykodonu i p tli ramienia D; cz steczki odpowiadaj ce wiartce 4 – na skutek hydrolizy wi zania w p tli ramienia D lub w rejonie jednoniciowym ł cz cym rami D i rami antykodonu.

Połowy b d wiartki 1 powstałe z cz ci 5' tRNA wyst powały znacznie rzadziej w ród analizowanych degradantów. Wyj tkiem były fragmenty 5' tRNA plastydowych, które stanowiły 14% całej frakcji organelowej (Rys. V.21). Pozostała cz analizowanych cz steczek to wiartki 2 powstałe na skutek zerwania wi zania fosfodiestrowego w p tli ramienia D (lub w rejonie jednoniciowym ł cz cym rami D i rami akceptorowe) i p tli antykodonowej, b d w p tli ramienia T C i w p tli antykodonowej – wiartki 3, a tak e

cz steczki pozbawione wiartki 1 (obejmującej wiartki 2, 3, i 4). Nie zaobserwowano, aby po hydrolizie wiązania fosfodiesterowego w płaszczyźnie ramienia D akumulowane były oba produkty degradacji. Nie zaobserwowano również produktów stanowiących $\frac{3}{4}$ tRNA pełnej długości, pozbawionych wiartki 4.



tRNA cytoplazmatyczne	39%	5%	35%	8%	4%	7%	2%
tRNA organellowe	50%	3%	22%	14%	8%	-	3%

Rysunek V.21. Procentowy udział poszczególnych produktów degradacji tRNA w analizowanej frakcji degradomu *A. thaliana* (z podziałem na tRNA pochodzenia cytoplazmatycznego i organellowego).

Spśród wszystkich produktów degradacji pochodzących z końca 3' tRNA, 74% zawierało sekwencję CCA (CCb d C), co sugeruje, iż powstały one z dojrzałych i funkcjonalnych cząstek.

W genomie *Arabidopsis thaliana* występuje od kilku do kilkudziesięciu genów kodujących tRNA o tym samym antykodonie. Spśród wszystkich tRNA w obrębie danego izotypu, te kodowane przez największą liczbę genów były najczęściej źródłem degradantów. Zaobserwowano jednak kilka wyjątków. W jednej z bibliotek nie znaleziono cząsteczki, która odpowiadałaby tRNA-Ser o antykodonie AGA, kodowanemu w genomie jądrowym przez 37 genów. Zaobserwowano natomiast produkty degradacji tRNA-Ser/TGA, dla którego znanych jest 9 genów i tRNA-Ser/GGA, kodowanego przez jeden gen. Podobnie, stwierdzono brak cząstek pochodzących z tRNA-Pro/TGG (45 genów), podczas gdy obecne były produkty degradacji tRNA-Pro/AGG (16 genów) i tRNA-Pro/CGG (5 genów). Również w przypadku tRNA-Val, występowały jedynie produkty degradacji tRNA-Val/TAC, który charakteryzuje się najmniejszą liczbą genów (7 genów) w obrębie tego izotypu (Tab. V.4; opracowano w oparciu o *Genomic tRNA Database*; Lowe&Eddy).

Biorąc pod uwagę, że często występowania synonimicznych kodonów w genach kodujących białka może być różna, porównano częstość, z jaką tRNA generowały degradanty z częstością, z jaką są wykorzystywane podczas biosyntezy białka (Tab. V.5).

Tabela V.4. Liczba genów tRNA kodujących czyste stezki o jednakowych antykodonach; kolorem czerwonym zaznaczono antykodony tRNA białych różniel zidentyfikowanych produkt6w degradacji (opracowano w oparciu o *Genomic tRNA Database*; Lowe&Eddy).

aminokwas	antykodon /liczba gen6w tRNA				sumaryczna liczba gen6w tRNA
Ala	AGC 16	GGC	CGC 7	UGC 10	33
Gly	ACC 1	GCC 23	CCC 5	UCC 12	41
Pro	AGG 16	GGG	CGG 5	UGG 45	66
Thr	AGU 10	GGU	CGU 6	UGU 8	24
Val	AAC 15	GAC	CAC 8	UAC 7	30
Phe	AAA	GAA 16			16
Asn	AUU	GUU 16			16
Lys			CUU 18	UUU 13	31
Asp	AUC	GUC 26			26
Glu			CUC 13	UUC 12	25
His	AUC	GUG 10			10
Gln			CUG 9	UUG 8	17
Ile	AAU 19	GAU		UAU 5	24
Met			CAU 24		24
Tyr	AUA	GUA 76			76
Supres			CUA	UUA	0
Cys	ACA	GCA 15			15
Trp			CCA 14		14
SeICys				UCA	0

Ser	AGA 37	GGA 1	CGA 4	UGA 9	ACU	GCU			64
Arg	ACG 9	GCG	CCG 4	UCG 6			CCU 8	UCU 9	36
Leu	AAG 12	GAG 1	CAG 3	UAG 10			CAA 10	UAA 6	42

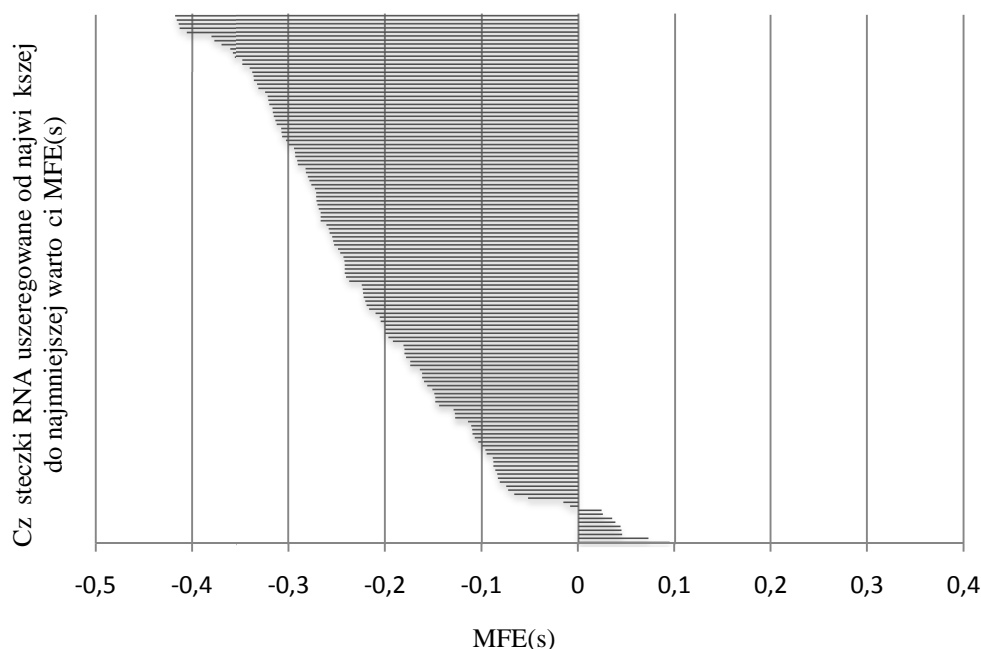
Tabela V.5. Wykorzystanie kodonów synonimicznych; kolorem czerwonym zaznaczono kodony dekodowane przez tRNA b d ce ródłem zidentyfikowanych produktów degradacji (opracowano w oparciu o *Genomic tRNA Database*; Lowe&Eddy).

aminokwas	wykorzystanie kodonów synonimicznych						wykorzystanie aminokwasu	
Ala	GCU 2,83	GCC 1,03	GCG 0,9	GCA 1,75				6,51%
Gly	GGU 2,22	GGC 0,92	GGG 1,02	GGA 2,42				6,58%
Pro	CCU 1,87	CCC 0,53	CCG 0,86	CCA 1,61				4,87%
Thr	ACU 1,75	ACC 1,03	ACG 0,77	ACA 1,57				5,12%
Val	GUU 2,72	GTC 1,28	GUG 1,74	GUA 0,99				6,73%
Phe	UUU 2,18	UUC 2,07						4,25%
Asn	AAU 2,23	AAC 2,09						4,32%
Lys			AAG 3,27	AAA 3,08				6,35%
Asp	GAU 3,66	GAC 1,72						5,38%
Glu			GAG 3,22	GAA 3,43				6,65%
His	CAU 1,38	CAC 0,87						2,25%
Gln			CAG 1,52	CAA 1,94				3,46%
Ile	AUU 2,15	AUC 1,85		AUA 1,26				5,26%
Met			AUG 2,45					2,45%
Tyr	UAU 1,46	UAC 1,37						2,83%
Supres			UAG 0,05	UAA 0,09				0,14%
Cys	UGU 1,05	UGC 0,72						1,77%
Trp			UGG 1,25					1,25%
SelCys				UGA 0,12				0,12%
Ser	UCU 2,52	UCC 1,12	UCG 0,93	UCA 1,83	AGU 1,4	AGC 1,13		8,93%
Arg	CGU 0,9	CGC 0,38	CGG 0,49	CGA 0,63			AGG 1,1 AGA 1,9	5,4%
Leu	CUU 2,41	CUC 1,61	CUG 0,98	CUA 0,99			UUG 2,09 UUA 1,27	9,35%

Tylko w kilku analizowanych przypadkach akumulowane produkty degradacji pochodziły z tych cz. steczek, których antykodon jest najczęściej wykorzystywany przez maszynę translacyjną komórki. S. to cz. steczki powstałe z tRNA-Thr/AGU, tRNA-Ala/AGC, tRNA-Gly/UCC, tRNA-Ile/AAU, tRNA-Pro/AGG oraz tRNA-Leu/AAG. Okazało się, że również tRNA o rzadko używanych antykononach mogły być źródłem degradantów. Doskonałym tego przykładem są tRNA argininowe, dekodujące reszty aminokwasowe z częstości 0,49%, 0,63%, 0,9%, których fragmenty występowały w obu bibliotekach. Pozostałe tRNA o rzadko wykorzystywanych kodonach (mniej niż 1%) będące prekursorami degradantów to: tRNA-Ala/CGC, tRNA-Gly/GCC, tRNA-Val/UAC, tRNA-His/GUG, tRNA-Cys/GCA, tRNA-Leu/UAG (Tab. V.5).

Analiza strukturalna

Aby określić stabilność termodynamiczną zidentyfikowanych produktów degradacji tRNA zastosowano opisaną poprzednio metodę wykorzystującą program MFOLD. W przypadku każdej cz. steczki wybrano tylko jeden z wygenerowanych modeli, ten, który charakteryzuje się najmniejszą energią swobodną. Następnie porównano wyznaczone dla nich współczynniki MFE(s) (Rys. V.22).



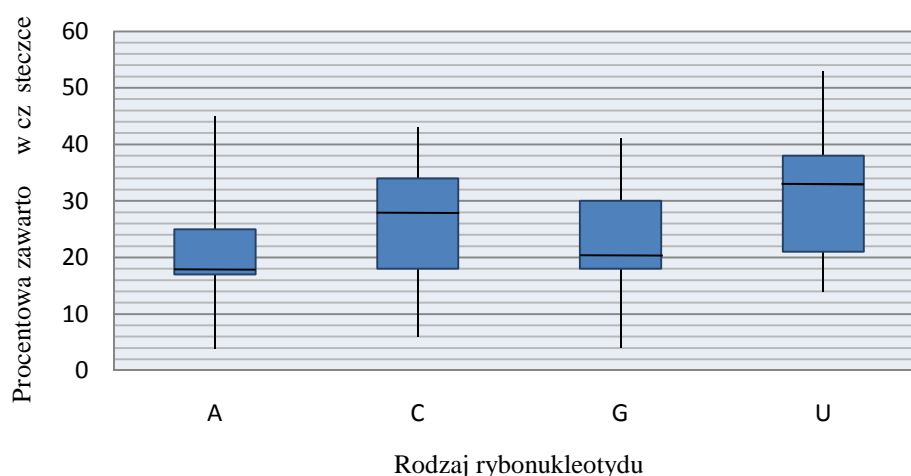
Rysunek V.22. Rozkład współczynnika MFE(s) dla cz. steczek zidentyfikowanych jako produkty degradacji tRNA; analiza łączona obu bibliotek.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że dla większości produktów degradacji tRNA, podobnie jak w przypadku produktów degradacji rRNA, współczynnik MEF(s) osiągał wartość $-0,1$ do $-0,3$. Natomiast dla 25% cz. steczek zanotowano współczynnik MFE(s) $-0,3$ i mniejszy (Rys. V.22).

V.1.4.4. Produkty degradacji mRNA

Analiza uzyskanych sekwencji wykazała, że produkty degradacji mRNA stanowi jedną z mniej licznych frakcji obu bibliotek. Łącznie zidentyfikowano 17 klonów wykazujących homologie do znanych cz. steczek mRNA, z czego 14 należało do biblioteki RNA18-73, natomiast 3 występowały wyłącznie w bibliotece RNA70 (z analiz wykluczono cz. steczki zaklasyfikowane jako produkty degradacji rRNA, dla których znaleziono miejsca dopasowania również w sekwencjach mRNA).

Długość cz. steczek tej frakcji degradatu zawierała się w przedziale od 17 do 49 nt. Analiza składu nukleotydowego pozwoliła wyznaczyć następujące mediany: A 18%, U 33%, C 28% a G 20%. Okazuje się zatem, że w cz. steczkach pochodzących z mRNA reszty GC (~49%) i AU (~51%) występują ze zbliżoną częstością. Porównując procentowy udział poszczególnych reszt nukleotydowych w produktach degradacji mRNA, tRNA i rRNA, można jednak zauważyć zmniejszenie udziału reszt CG w populacji cz. steczek zaklasyfikowanych jako mRNA (Rys. V23).



Rysunek V.23. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów (A, C, G, U) w produktach degradacji mRNA. Podstawa i wierzchołek wskazują najniższą i najwyższą wartość. Polem niebieskim oznaczono rozstęp kwartylny czyli przedział zawierający połowę populacji cz. steczek; pogrubioną poziomą linią wskazano wartość mediany.

A 41% badanych produktów degradacji mRNA pochodzi z cz steczek zakodowanych na chromosomie 1. Po 17,5% odpowiada cz steczkom, których geny zlokalizowane s na chromosomach: 2 i 5, natomiast po 12% na chromosomie 3 i 4.

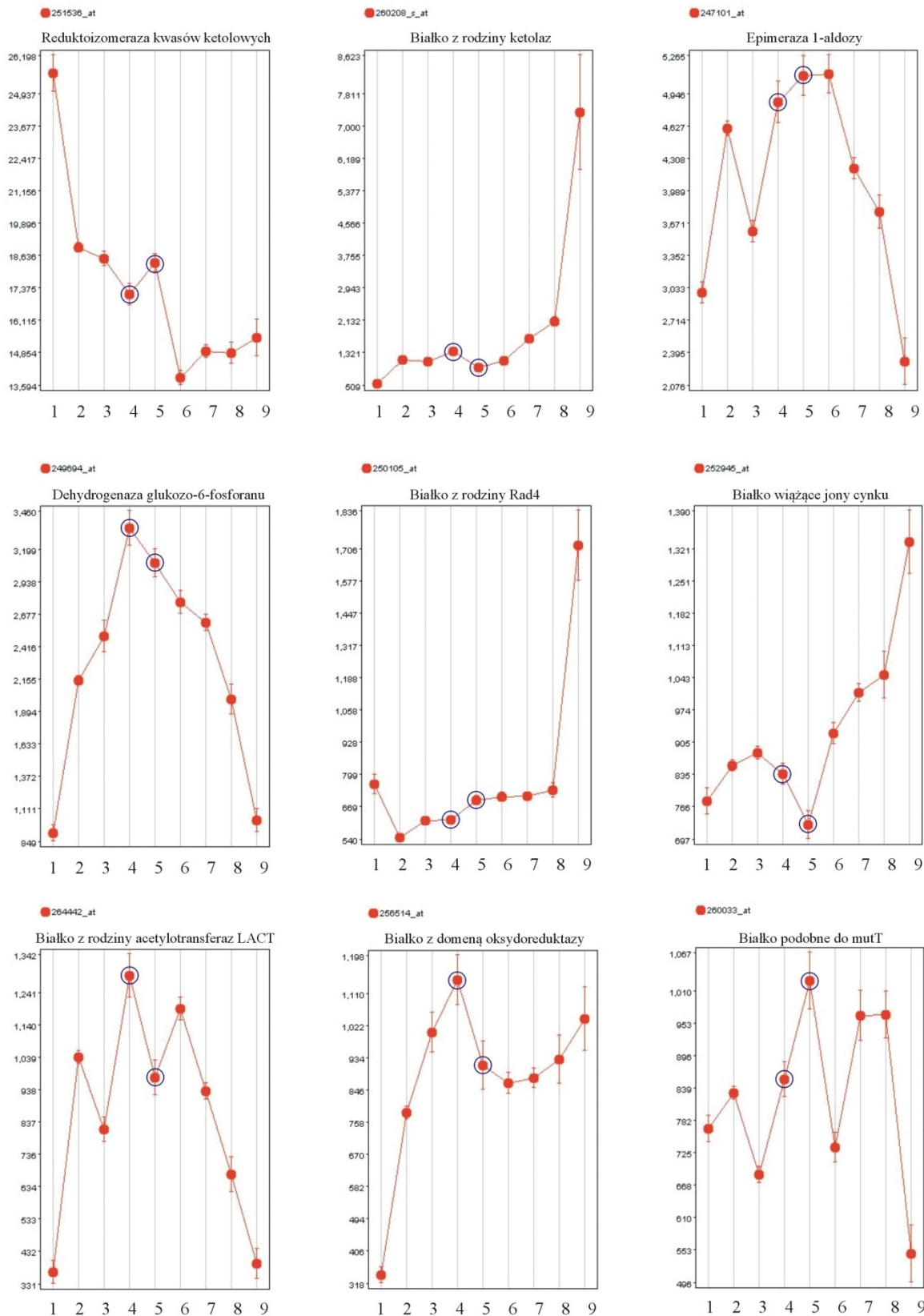
Cz steczki mRNA/pre-mRNA s bardzo zróżnicowane pod wzgl dem wielko ci i stabilno ci. Ze wzgl du na ich heterogenn budow sprawdzono, które elementy składowe mRNA/pre-mRNA s ródłem produktów degradacji. Stwierdzono, e 47% zidentyfikowanych degradantów pochodziło z rejonów koduj cych (egzonom), 23 % to fragmenty rejonów nieulegaj cych translacji z ko ca 5' (5' UTR). Poza tym, 18% tej frakcji degradomu to cz steczki pochodz ce z intronów, a 6% to cz steczki pochodz ce z rejonów poł cze egzon/intron. Nie zaobserwowano natomiast adnego fragmentu odpowiadaj cego rejonowi nieulegaj cemu translacji z ko ca 3' (3' UTR). W przypadku jednej z badanych cz steczek (produktu degradacji prseudogenu At2g07686) nie zdefiniowano miejsca w mRNA, z którego jest uwalniany.

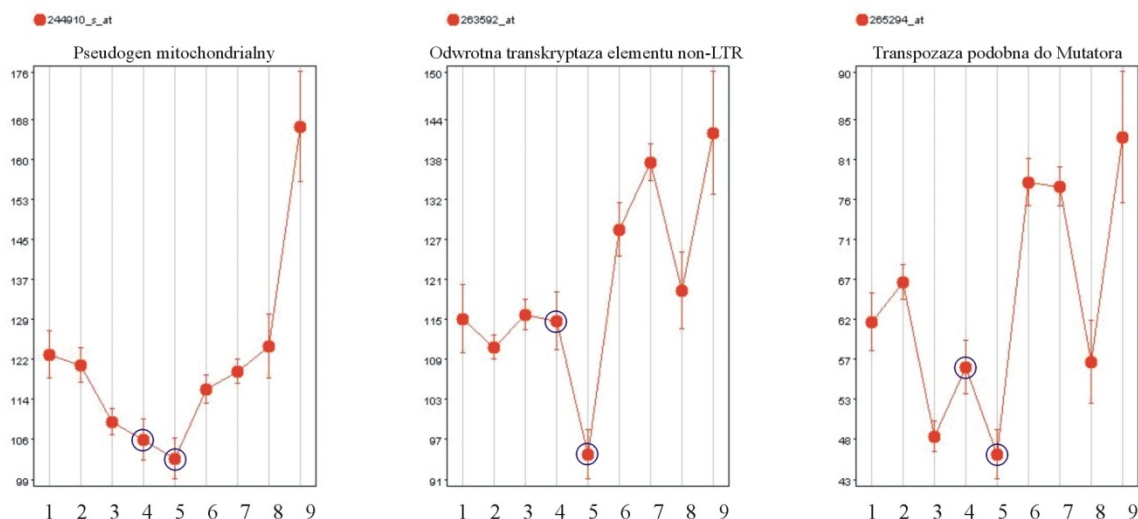
Sprawdzono równie , jakie klasy białek kodowane s przez mRNA, z których powstaj analizowane produkty degradacji. Okre lono, e 30% degradantów pochodzi z mRNA hipotetycznych białek o niepoznanej dot d funkcji, a 18% stanowi produkty degradacji mRNA białek uczestnicz cych w rozprzestrzenianiu elementów mobilnych genomu (mRNA transpozazy, mRNA odwrotnej transkryptazy, mRNA dla białka mutT). Pozostałe to pochodne mRNA: białka zaangażowanego w napraw DNA, reduktioizomerazy, acylotransferazy, białka z rodziny kaleozyn, epimerazy aldozy, białka wi cego jony cynku, białka zawieraj cego N-ko cow domen oksydoreduktazy oraz pseudogenu.

Korzystaj c z programu Genevestigator, przeanalizowano poziom ekspresji genów koduj cych wy ej wymienione mRNA, w ró nych stadiach rozwojowych *Arabidopsis thaliana*. Poniewa materiał badawczy wykorzystany do konstrukcji obu bibliotek cDNA stanowiły dorosłe rozety li ciowe, szczególn uwa g po wi cono wła nie temu stadium rozwojowemu ro liny (stadium pomi dzy całkowitym wykształceniem rozety a wczesnym etapem zawi zywania p du kwiatowego). W przypadku 67% analizowanych genów o znanym profilu ekspresji, zaobserwowano spadek ich aktywno ci transkrypcyjnej. S to geny koduj ce: białko z rodziny kaleozyn, dehydrogenaz glukozy-6-fosforanu, białko wi ce jony cynku, białko z rodziny acetylotransferaz LACT, białko z N-ko cow domen oksydoreduktazy, pseudogen mitochondrialny, odwrotna transkryptaza elementu non-LTR oraz transpozaza podobna do Mutatora (Rys. V.24).

W przypadku pozostałych 33% analizowanych genów zaobserwowano zjawisko przeciwne. Przej ciu pomi dzy stadium dojrzałej rozety a wczesnym etapem zawi zywania

p du kwiatowego, towarzyszył wzrost ekspresji genu. Tak sytuację odnotowano dla mRNA reduktoizomerazy kwasów ketolowych, epimerazy 1-aldozy, białka z rodziny białek naprawy DNA Rad4 oraz białka podobnego do mutT.





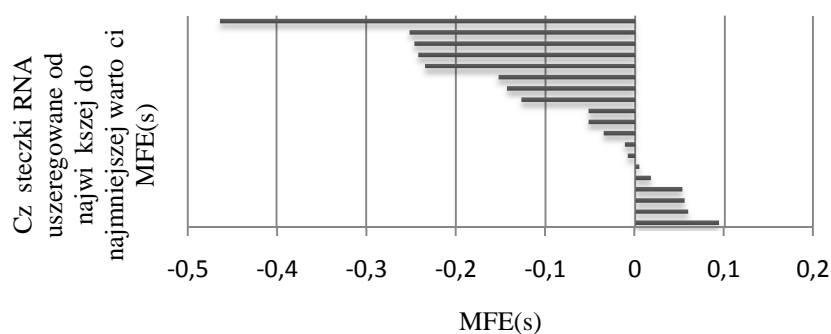
Rysunek V.24 Analiza poziomu ekspresji genów kodujących mRNA, których produkty degradacji zaobserwowano w obu bibliotekach (Hrutz, 2008). Legenda (stadia rozwojowe *Arabidopsis thaliana*): 1 – kiełkująca nasiona; 2 – siewki; 3 – młode rozety; 4 – dojrzałe rozety, 5 – dojrzałe rozety na etapie zawiązywania pędu kwiatowego; 6 – roślina z zawiązkami kwiatów; 7 – roślina z dojrzałymi kwiatami; 8 – roślina z kwiatami i młodymi strąkami; 9 – roślina z dojrzałymi strąkami. Polem niebieskim zakreślono stadia rozwojowe, którym odpowiadał materiał badawczy.

Powyższa analiza pozwoliła również stwierdzić, iż badane produkty degradacji mRNA pochodzą z transkryptów genów o zasadniczo różnym poziomie ekspresji w roślinie. Są to zarówno pochodne genów ulegających bardzo wysokiej ekspresji (reduktoizomeraza kwasów ketolowych i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowej), jak i pochodne genów ulegających ekspresji na bardzo niskim poziomie (pseudogen mitochondrialny, odwrotna transkryptaza retroelementu non-LTR i transpozaza podobna do Mutatora).

Analiza strukturalna

Aby sprawdzić czy produkty degradacji mRNA zdolne są do przybierania stabilnych termodynamicznie struktur drugorzędowych poddano je analizie strukturalnej za pomocą programu MFOLD. Podobnie, jak w przypadku analiz wcześniej opisanych frakcji degradatu, poszukiwano struktur o najmniejszej energii swobodnej, dla których obliczono współczynnik MFE(s) (Rys. V.25).

Uzyskane wyniki sugerują, że w przypadku nieco ponad 40% cząsteček współczynnik MFE(s) osiągnął wartość $-0,1$ do $-0,25$. Współczynnik MFE(s) jednej z cząsteček (produkt degradacji mRNA oksydoreduktazy) wyniósł natomiast $-0,46$.



Rysunek V.25. Rozkład współczynnika MFE(s) dla klonów cDNA zidentyfikowanych jako produkty degradacji mRNA; analiza 1 czona obu bibliotek.

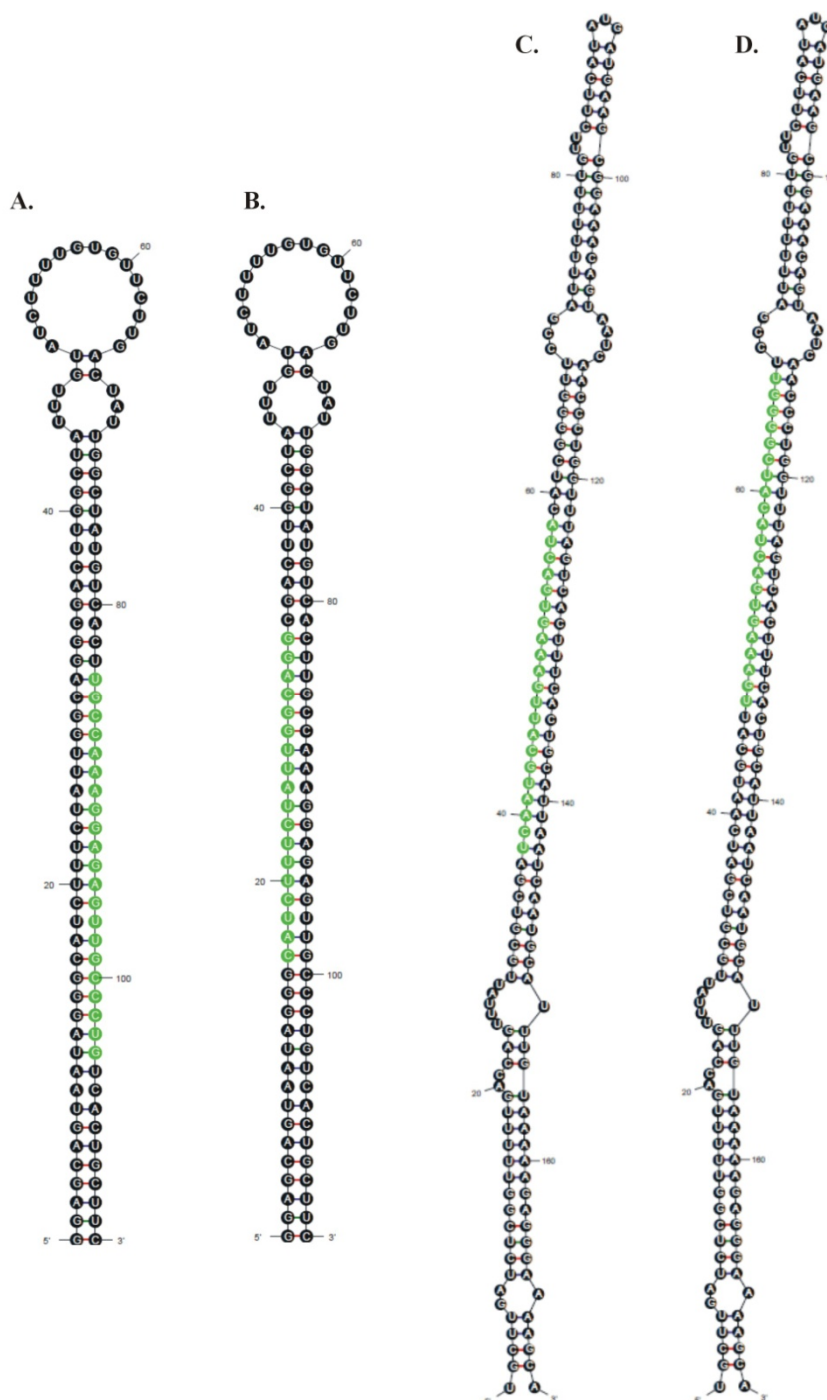
V.1.4.5. Produkty degradacji związane z biogenez małych niekodujących RNA i transkryptów pochodzących z rejonów mi dzygenowych

Obok produktów degradacji rRNA, tRNA i mRNA, w obu bibliotekach wystąpiły również cz. steczki zaklasyfikowane jako małe niekodujące RNA, bądź fragmenty ich prekursorów. Istniała także do liczna frakcja cz. steczek, które odpowiadały niescharakteryzowanym jak dotychczas transkryptom pochodzącym z rejonów mi dzygenowych. Z dalszej analizy wykluczono cz. steczki, w przypadku których wcześniej potwierdzono, iż pełni one funkcje miRNA lub siRNA (4 cz. steczki). Zgodnie z przyjętą na wstępie definicją nie można ich było zakwalifikować jako produkty degradacji.

Populacja degradantów związanych z biogenez małych niekodujących RNA stanowiła 8% wszystkich cz. steczek biblioteki RNA18-73 oraz 7% biblioteki RNA70, licząc łącznie 13 cz. steczek. Długo analizowanych fragmentów wynosiła od 17 do 29 nt (wyjątek stanowiła jedna cz. steczka o wielkości 86 nt). Z uwagi na wysoki stopień homologii do różnych obszarów genomu *A. thaliana*, cz. steczek nie było jednoznacznie określone jakie jest pochodzenie poszczególnych cz. steczek. Oszacowano, że 15% degradantów to produkty rozpadu małych jądrowych RNA (U2 i U4.2 snRNA), kolejne 15% stanowiły cz. steczki zaklasyfikowane jako fragmenty prekursorów miRNA. Pozostałe 70% odpowiadało małym RNA o nieznanej funkcji. W przypadku biblioteki RNA18-73 z największą cz. steczką identyfikowane były cz. steczki: *small RNA Ath_wt_21944* (19nt, 38 niezależnych powtórzeń) oraz *small RNA Ath_wt_17407* (17nt, 11 niezależnych powtórzeń).

Dwie cz. steczki należą do frakcji degradantów związanych z biogenez miRNA wydają się być szczególnie interesujące z uwagi na swoją lokalizację w obrębie cz. steczki prekursora. W przypadku MIR161, pozycje kodujące cz. steczki miRNA wyznaczają nukleotydy 38 i 58 licząc od końca 5' sekwencji prekursora. Inne pozycje w tym samym

prekursorze miR161 wyznaczaj ko ce cz steczki zidentyfikowanej w bibliotece RNA18-73. S to nukleotydy 47 i 67 lic z c od ko ca 5' pre-miRNA. Okazało si zatem, e analizowana cz steczka posiadała 12 nt fragment z ko ca 3' dojrzałego MIR161 oraz 10 nt fragment prekursora (Rys. V.26). Druga ze zidentyfikowanych cz steczek stanowiła ni anty-miRNA o nazwie MIR399.



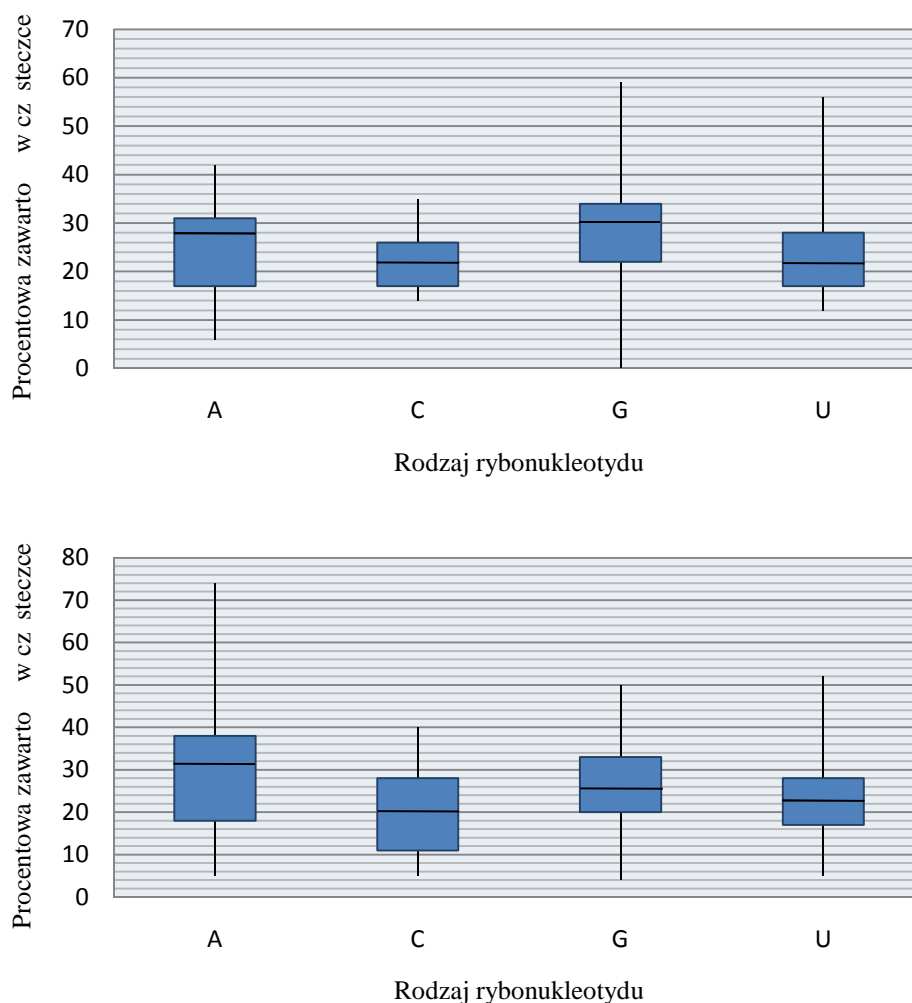
Rysunek V.26. Prekursory miR399c (A i B) oraz miR161 (C i D); kolorem zielonym (A i C) wskazano pozycj miRNA w prekursorze; kolorem zielonym (B i D) wskazano pozycj analizowanej cz steczki biblioteki RNA18-73 (opis w tek cie).

Cz stezki odpowiadaj ce rejonom mi dzygenowym *A. thaliana* stanowiły 18% klonów biblioteki RNA18-73 (29 różnych cz stezek) i zaledwie 3% biblioteki RNA70 (2 cz stezki). Chocia długo tych cz stezek była zróżnicowana i wynosiła od 17 do 46 nt, zaobserwowano zdecydowaną przewagę 23-24 nt cz stezek (44%).

42% analizowanych sekwencji wykazywało dopasowanie do rejonów mi dzygenowych znajdujących się na chromosomie 2, 23% na chromosomie 1. Po 13% cz stezek odpowiadało rejonom mi dzygenowym chloroplastów i chromosomu 5, a po 3% pochodziło z chromosomu 3 i 4. Jedna z analizowanych cz stezek, zaklasyfikowana jako produkt transkrypcji telomerów, nie została przypisana do konkretnego chromosomu.

Analiza składu nukleotydowego frakcji degradantów zakwalifikowanych jako związane z biogenez małych RNA i transkrypcją rejonów mi dzygenowych wykazała, że obie populacje wykazują zbliżoną zawartość poszczególnych reszt nukleotydowych (Rys. V.27. A i B).

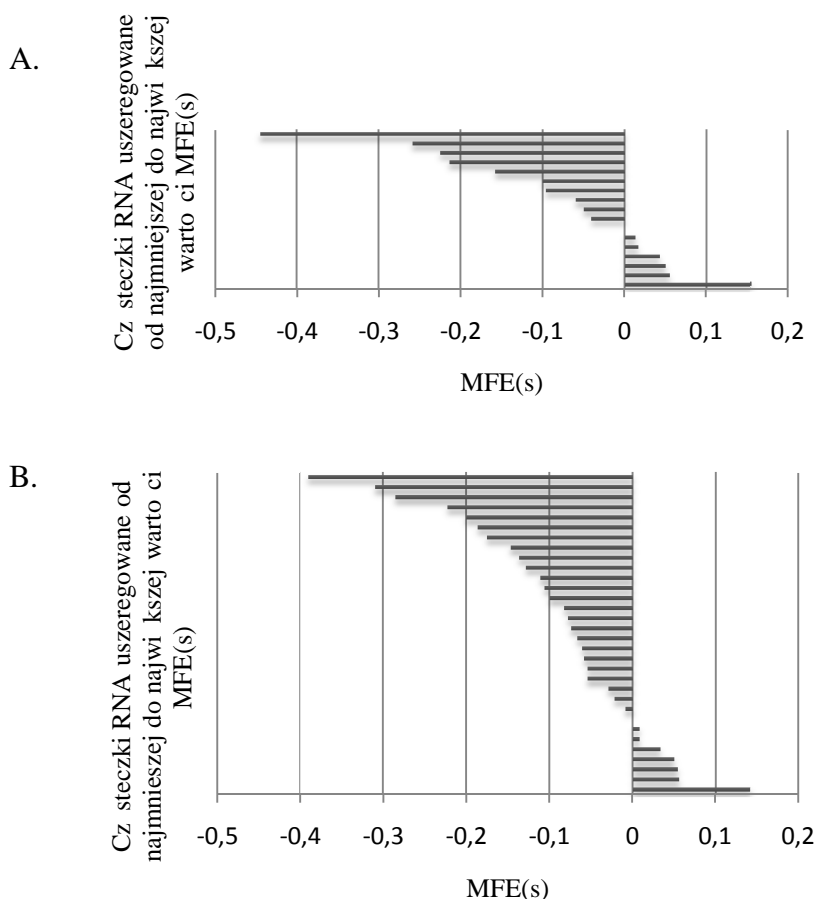
Mediany określające występowanie poszczególnych reszt nukleotydowych wynosiły A 28%, C 22%, G 30%, i U 21% w przypadku degradantów związanych z biogenez małych RNA oraz A 31%, C 20%, G 26% i U 23% dla cz stezek pochodzących z rejonów mi dzygenowych. Oszacowano, że połowa frakcji cz stezek zaklasyfikowanych jako związane z biogenez małych RNA wykazała od 14% do 22% zawartości C i od 12% do 21% U, przy czym zdarzały się również cz stezki o dużej, sięgającej 56%, zawartości U. Połowa frakcji zawierała również 28%, lub więcej A i od 30% do 59% G. Dysproporcje pomiędzy zawartością A i C są większe w przypadku cz stezek pochodzących z rejonów mi dzygenowych. Połowa cz stezek tej frakcji zawierała od 5% do 20% C, przy czym również połowa zawierała powyżej 31% (najwyższą wartość: 74%) A. Uwzględniając wymienione dysproporcje w zawartości poszczególnych nukleotydów, można stwierdzić, że w sekwencji wikszości badanych cz stezek, które pochodzą z rejonów mi dzygenowych reszty GC (~46%) występują stosunkowo rzadziej niż AU (~54%). Natomiast w przypadku małych RNA średnia zawartość GC i AU okazała się zbliżona (~50%).



Rysunek V.27. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów (A, C, G, U) w produktach degradacji związanych z biogenez małych niekodujących RNA (A) i transkryptów rejonów mi dzygenowych (B). Podstawa i wierzchołek wskazują najniższą i najwyższą wartość. Polem niebieskim oznaczono rozstęp kwartylny, czyli przedział zawierający połowę populacji cz. steczek; pogrubioną poziomą linię wskazano wartość mediany.

Analiza strukturalna

Aby sprawdzić, czy cz. steczki zaklasyfikowane jako związane z biogenez małych RNA i transkrypcji rejonów mi dzygenowych wykazują zdolność przybierania stabilnych termodynamicznie struktur drugorzędowych, poddano je analizie przy użyciu programu MFOLD. Okazało się, że w przypadku większości analizowanych cz. steczek współczynnik MFE(s) wynosił od 0 do -0,2 (dla transkryptów rejonów mi dzygenowych) oraz od 0 do -0,3 (dla cz. steczek związanych z biogenez małych niekodujących RNA). Tylko dla kilku cz. steczek przyjmował on wartość mniejszą niż -0,3 (Rys. V.28 A i B).



Rysunek V.28. Rozkład współczynnika MFE(s) dla cz. steczek RNA zwi zanych z biogenez małych niekoduj cych RNA (A) oraz transkryptów rejonów mi dzygenowych (B); analiza obu bibliotek.

V.1.5. Identyfikacja sekwencji komplementarnych do stabilnych produktów degradacji

W kolejnym etapie bada postanowiono stwierdzi czy zidentyfikowane produkty degradacji wi kszych funkcjonalnych jednostek transkrypcyjnych mog stanowi ródło cz. steczek regulatorowych. Aby pełni takie funkcje powinny one wykazywa pełn lub cz. ciow komplementarno do genomowego DNA lub innych transkryptów. Uzyskane wyniki sugeruj , e 35% opisanych powy ej produktów degradacji wykazuje cz. ciow komplementarno do nici koduj cej, a tym samym do mRNA genów koduj cych białka (Tab. V.5).

Tabela V.6. Lista mRNA, do których komplementarne s zidentyfikowane produkty degradacji; kolorem pomarańczowym oznaczono fragmenty dotyczące: produktów degradacji tRNA, niebieskim – rRNA, żółtym – mRNA, różowym – związane z biogenezą małych niekodujących RNA, zielonym – cząsteczki pochodzące z rejonów mitochondrialnych.

mRNA/pre-mRNA o komplementarnej sekwencji	lokalizacja	biblioteka	długość RNA	długość trafiaenia
Cohesion family protein (SYN1) splice variant 1 (At5g05490)	egzon	RNA70/ RNA18-73	55	16
Expressed protein (At1g53400)	intron	RNA70/ RNA18-73	30	23
SNF7 family protein (At3g59290); epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein (At1g03950)	intron intron	RNA18-73	21	14 14
Cytochrome P450 (At1g74550)	egzon	RNA18-73	28	15
LAC12 laccase / diphenol oxidase (At5g05390)	egzon	RNA18-73	28	19
Expressed protein (At1g53400)	intron	RNA18-73	37	34
Hypothetical protein (At3g20362)	egzon	RNA70/ RNA18-73	41	36
Non-LTR transposone family (LINE) (At3g32110)	egzon	RNA70/ RNA18-73	23	14
F-box family protein (At3g21120); Calcineurin -like phosphoesterase family protein (At2g04920)	egzon egzon	RNA18-73	36	15 15
Mutator-like transposase family (At3g04605)	egzon	RNA70/ RNA18-73	23	14
Expressed protein (At4g12070)	intron	RNA18-73	21	21
L-ascorbate oxidase (At5g21100)	egzon	RNA18-73	26	14
Phosphate/triose-phosphate translocator (At5g46110)	intron	RNA70/ RNA18-73	22	22
Copia-like retrotransposon family (At2g07683)	egzon	RNA18-73	35	21
L-asparaginase, putative / L-asparagine amidohydrolase (At3g16150)	egzon	RNA18-73	34	15
Expressed protein (At1g63410)	intron	RNA70/ RNA18-73	28	15
Endo-polygalacturonase (At2g41850)	egzon	RNA70/ RNA18-73	34	16
Expressed protein (At4g22270)	intron	RNA70/ RNA18-73	30	26
Hypothetical protein (AK230153)	-	RNA18-73	19	19
Hypothetical protein (AK230153)	5'UTR	RNA18-73	17	17
importin alpha-like protein Impa1 (Y15224) putative DNA repair and transcription factor XBP2 (XPB2) and DNA repair and transcription factor XPB1 (XPB1) (AY550923); DEAD/DEAH box helicase, putative (AT2G47330)	5'UTR intron egzon	RNA18-73	16	16 16 16
Hypothetical protein (AT3G16750) 60S ribosomal protein-related (AT2G42650)	5'UTR 5'UTR	RNA18-73	18	14 14
cyclin-dependent kinase inhibitor p22ack1 (AF208692)	5'UTR	RNA18-73	16	15
Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	40	40

Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	18	18
Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	26	21
Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	24	24
Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	30	29
Hypothetical protein (AK230153)	5'UTR	RNA18-73	27	27
Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	33	27
Hypothetical protein (AK230153)	3'UTR	RNA18-73	16	16
Hypothetical protein (AK230153)	egzon/3'UTR	RNA18-73	19	19
Cytochrome P450 family protein (At3g20090) Hypothetical protein (AK230153)	egzon	RNA18-73	25	15 25
Expressed protein (At2g39680)	egzon	RNA18-73	36	19
ATPase plasma membrane-type / proton pump (At2g07560)	egzon	RNA70/ RNA18-73	17	15
Diacylglycerol O-acyltransferase DGAT (At2g19450)	intron	RNA18-73	31	18
Homeobox-leucine zipper transcription factor family protein (At5g46010)	egzon	RNA18-73	29	15
DNAJ heat shock family protein (At3g17830); Auxin transport protein (At1g77110)	egzon/intron intron	RNA18-73	44	16 22
Expressed protein (At2g25260) clathrin binding protein	intron intron	RNA18-73	38	18 15
Non-phototropic hypocotyl 3 (NPH3) (At5g64330) Hypothetical protein (AK230153)	egzon	RNA18-73	21	14 21
Unnamed protein (AT2G23700)	egzon	RNA18-73	17	14
Hypothetical protein (AT3G01710)	egzon /intron	RNA18-73	38	36
DNA repair protein Rad4 family (At5g16630)	egzon	RNA18-73	21	17
Leucine-rich transmembrane kinase family (At5g06820); AAA-type ATPase family protein (At1g04730)	intron egzon	RNA70	49	18 18
Expressed protein (At2g29670)	intron	RNA18-73	33	15
pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (At5g28340); 3-phosphoserine phosphatase (PSP) (At1g18640)	intron intron	RNA18-73	36	15 15
lecithin:cholesterol acyltransferase family protein / LACT family protein (At1g27480); glycosyl hydrolase family 38 protein (At5g13980); peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / FK506- binding protein (ROF1) (At3g25230)	egzon egzon egzon	RNA18-73	23	15 14 14
Expressed protein (At2g45380)	intron	RNA18-73	23	20
Pseudogene hypothetical protein (At1g51172)	egzon	RNA70	19	15
Expressed protein (At5g35320)	egzon	RNA70	27	14
Hypothetical protein (AT3G06895)	egzon /3'UTR	RNA18-73	18	17
Small nuclear ribonucleoprotein E/snRNP-E/Sm protein E (At2g18740)	intron	RNA18-73	18	14
Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) (At5g46470); Thylakoid membrane one helix protein (OHP) (At5g02120) unknown protein (At2g39680)	egzon egzon	RNA18-73	20	14 14 20

Hypothetical protein (AT4G27040)	5' UTR	RNA18-73	24	15
pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (AT1G62910)	egzon	RNA18-73	21	15
Hypothetical protein (AK230153); raffinose synthase family protein / seed imbibition protein-related (AT4G01265)	3'UTR intron	RNA70/ RNA18-73	18	18 18
Calcium-dependent protein kinase (AT5G23580)	egzon	RNA18-73	24	15
Pseudogene hypothetical protein (At1g36810)	egzon	RNA18-73	24	24
Purine permease 1 (At1g28230)	intron	RNA18-73	24	24
CACTA-like transposase family (Trp2/En/Spm)	egzon	RNA18-73	24	23
Pseudogene hypothetical protein (At4g08022)	egzon	RNA18-73	15	15
Pseudogene similar to putative helicase (AT2G07744)	-	RNA18-73	28	16
Glycoside hydrolase family 77 protein (At2g40840); Disproportionating enzyme 2 (AT2G36810)	intron	RNA18-73	32	16 15
Glycosyl hydrolase family 1 protein (At1g60090)	egzon	RNA18-73	47	16
universal stress protein (USP) family protein / early nodulin ENOD18 family protein (At3g03270); RNA recognition motif (RRM)-containing protein (At5g54580)	egzon egzon	RNA18-73	19	16 16

W ród cz steczek, które wykazuj pełn lub cz ciow komplementarno do transkryptów genów koduj cych białka, znajduj si przedstawiciele wszystkich badanych frakcji obu bibliotek. Długo dopasowania wynosi 20 i wi cej nukleotydów dla 26% analizowanych przypadków, 19-17 nt dla 17% i 16-14 nt dla 57% badanych cz steczek. Najcz cie, rejon komplementarny wyst puje w obr bie sekwencji koduj cych mRNA – egzonów (46%), rzadziej, dopasowanie dotyczy rejonów niekoduj cych – intronów (29%), UTR (20%), poł cze egzon/intron lub egzon/UTR (5%).

V.2. Wpływ czynników endo- i egzogennych na skład degradomu RNA

W kolejnym etapie badań postanowiono stwierdzić, w jakim stopniu wybrane czynniki endogenne (wewnątrzkomórkowy poziom małych regulatorowych RNA) oraz egzogenne (stres osmotyczny) wpływają na skład degradomu RNA.

Aby ocenić wpływ regulatorowych RNA przeprowadzono analizę preparatów RNA<120 izolowanych z listy 4 mutantów *A. thaliana* z których każdy posiadał jeden dysfunkcyjny gen *dcl*. W celu zbadania wpływu stresu osmotycznego analizie poddano preparaty RNA<120 izolowane z roślin wzrastających w warunkach silnego zasolenia.

V.2.1. Deficyt małych regulatorowych RNA jako czynnik endogenny wpływający na skład degradomu

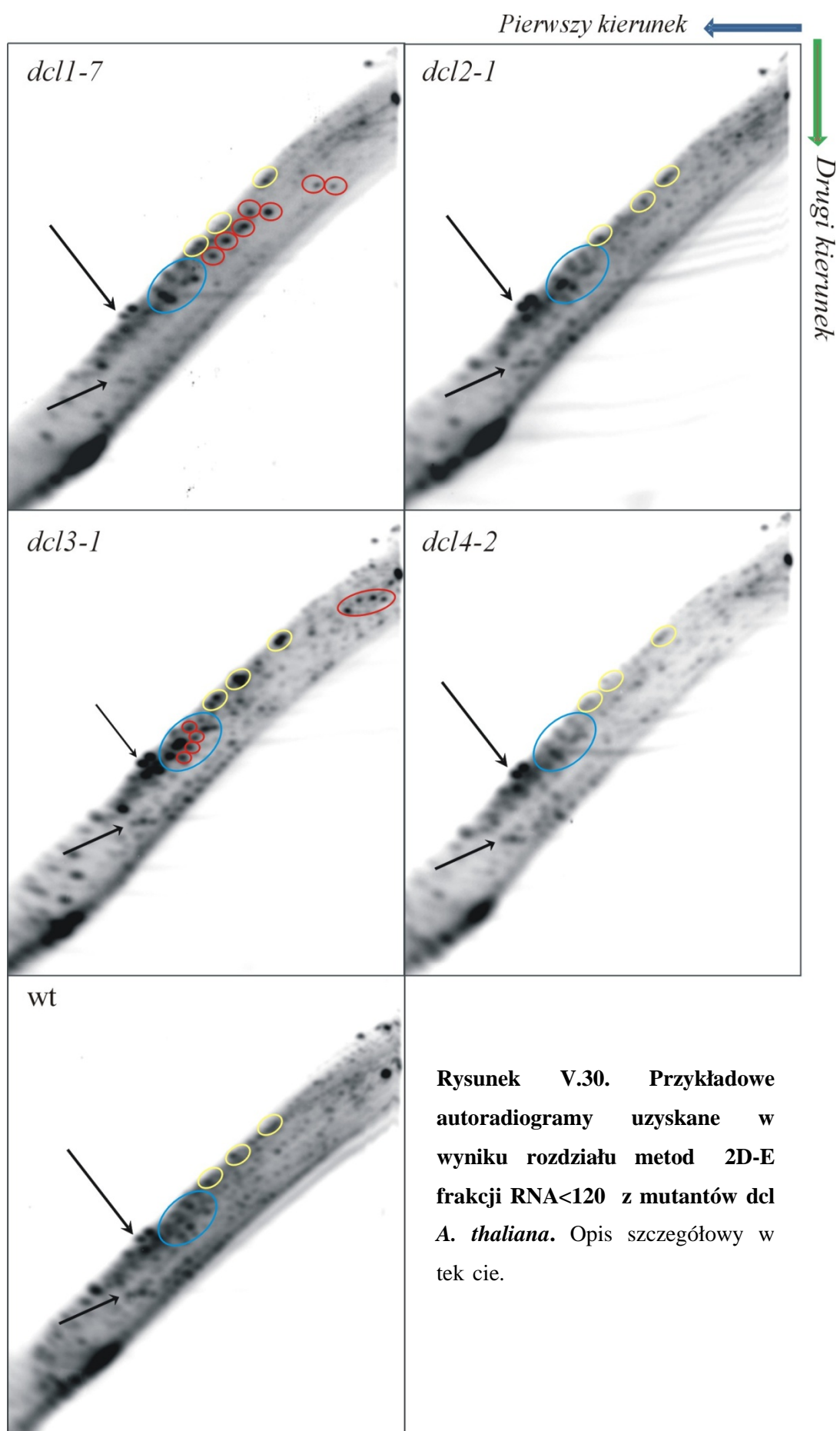
Wiadomo, iż w genomie *A. thaliana* występują cztery geny kodujące rybonukleazy typu Dicer (DCL1-4). W eksperymencie wykorzystano zatem komercyjnie dostępne i dobrze poznane linie mutantów *A. thaliana* (*dcl1-7*, *dcl2-1*, *dcl3-1*, *dcl4-2*), u których jeden z genów DCL jest defektywny (Materiały III.2). Rośliny z linii *dcl2-1*, *dcl3-1*, *dcl4-2* to mutanty powstałe poprzez insercję elementu T-DNA w obrębie genu *dcl*, co skutkuje produkcją skróconej wersji białka. W mutancie *dcl1-7* doszło natomiast do zamiany reszty prolinowej (P415) w serynową i zaburzenia funkcji domeny helikazy RNA. Mutant *dcl1-7* wykazywał zaburzenia szlaku syntezy miRNA a *dcl2* produkcji ta-siRNA oraz siRNA indukowanych infekcją wirusów. Mutacja w genie *dcl3* wpływała negatywnie na biogenezę 24-nt siRNA pochodzących z transpozonów oraz retroelementów i odpowiedzialnych za metylację chromatyny. Mutant *dcl4-2* był niezdolny do produkcji pierwszorzędowych 21-nt siRNA pochodzących z endo- lub egzogennych sekwencji powtórzonych oraz drugorzędowych siRNA (ta-siRNA) zaangażowanych w przekaz sygnału wyciszania. Spośród wszystkich czterech analizowanych linii, tylko *dcl1-7* i *dcl4-2* wykazywały zmieniony fenotyp. Rośliny *dcl1-7* charakteryzowały: zaburzenia rozwojowe, spowolniony wzrost, niedorozwój części organów generatywnych, mniejszy rozmiar, zaburzenia symetrii listy oraz opóźnienie w kwitnieniu. Rośliny *dcl4-2* pomimo normalnego tempa rozwoju, wykazywały natomiast zmieniony pokrój listy. Organy te u mutantów *dcl4-2* były wydłużone, o podwiniętych brzegach i silnie rozwiniętych włoskach dolnej powierzchni listy. Rośliny *dcl2-1* i *dcl3-1* nie wykazywały zmian fenotypowych (Rys. V.29).



Rysunek V.29. Pokrój mutantów *A. thaliana*; od góry: ro lina po 2 tygodniach wzrostu, 5 tygodniach wzrostu, li ro liny dorosłej
A – *dcl1-7*, B – *dcl2-1*, C – *dcl3-1*, D – *dcl4-2*, E – ro lina typu dzikiego

Aby ustalić, w jakim zakresie skład degradomu RNA zależy od aktywności enzymów zaangażowanych w biogenezę małych regulatorowych RNA wyizolowano z liści opisanych powyżej mutantów (*dcl1-7*, *dcl2-1*, *dcl3-1*, *dcl4-2*) preparaty RNA <120, znakowano je radioizotopowo i rozdzielano w płacach poliakryloamidowych w dwóch kierunkach. Otrzymane autoradiogramy przedstawiono na Rys. V.30.

Uzyskane wyniki sugerują, iż wraz ze zmianą aktywności enzymów uczestniczących w biogenezie małych regulatorowych RNA, zmienia się również obraz degradomu RNA. Obserwowane różnice nie były jednak drastyczne. Można zatem sądzić, iż w większości przypadków analizowany proces degradacji, jest niezależny od zjawiska RNAi. Najwięcej zmian zanotowano w obrazie degradomu mutantu *dcl1-7*, co może mieć związek z zahamowaniem ukierunkowanej degradacji mRNA przy udziale miRNA. W tym przypadku zaobserwowano pojawienie się przynajmniej 7 charakterystycznych plam (na Rys. V.30. *dcl1-7* oznaczone czerwonym okręgiem), nieobecnych na elektroforegramach roliny dzikiej i pozostałych mutantów.



Rysunek V.30. Przykładowe autoradiogramy uzyskane w wyniku rozdziału metod 2D-E frakcji RNA<120 z mutantów *dcl* *A. thaliana*. Opis szczegółowy w tekście.

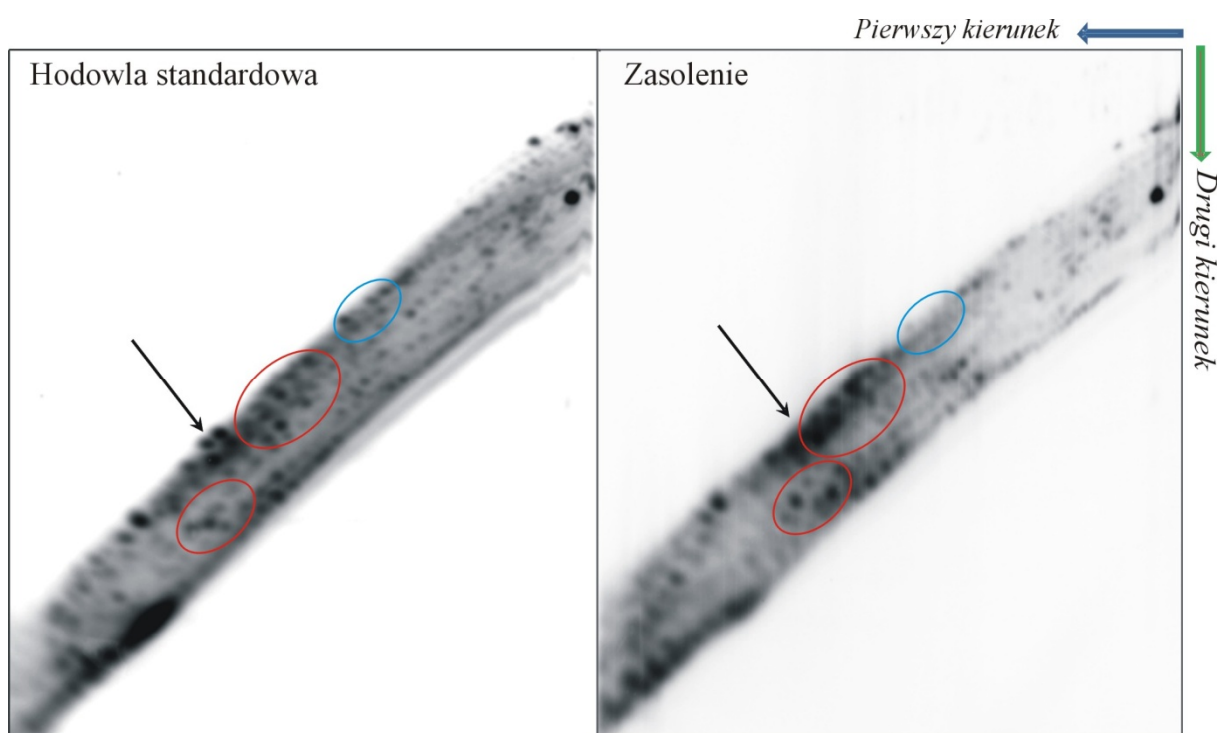
W porównaniu z rolin typu dzikiego, preparat RNA<120 z mutantu *dcl1-7*, wykazywał zmniejszoną liczbę czeczek w szczególności tych występujących w górnym rejonie elektroforegramu. Dało się również zauważyć osłabienie intensywności kilku charakterystycznych plam ulokowanych w rodkowym rejonie elektroforegramu (na Rys. V.30. *dcl1-7* oznaczone strzałką) przy jednoczesnym wzmocnieniu innych (na Rys. V.30. *dcl1-7* oznaczone niebieskim okręgiem). Skład preparatu RNA12-120 mutantu *dcl3-1* także odbiegał od pozostałych, a w szczególności od obrazu rozdziału preparatu pozyskanego z roliny dzikiej. I tym razem zaobserwowano pojawienie się kilku nowych, czeczek (na Rys. V.30. *dcl3-1* oznaczone czerwonym okręgiem) oraz zdecydowane zwiększenie akumulacji niektórych występujących także w pozostałych preparatach (na Rys. V.30. *dcl3-1* oznaczonych żółtym okręgiem). Skład preparatów RNA12-120 uzyskanych dla mutantów *dcl2-1* i *dcl2-2* wydaje się zbliżony do wzorca charakteryzującego rolinę dziką. Wykazują one zaledwie niewielkie różnice (na Rys. V.30. *dcl2-1* i *dcl2-2* oznaczone okręgiem w kolorze niebieskim).

V.2.2. Stres osmotyczny jako czynnik egzogeny wpływający na skład degradomu

Aby ocenić wpływ czynników egzogeny na skład degradomu RNA poddano analizie preparaty RNA<120 izolowane z *A. thaliana* hodowanych 6 godzin w warunkach silnego zasolenia. Otrzymane RNA znakowano radioizotopowo a następnie rozdzielano metodą 2D-E. Uzyskane wyniki przedstawione zostały na Rys. V.31.

W przypadku roliny poddanej stresowi osmotycznemu, zaobserwowano zmiany w stosunku do roliny kontrolnej, rozkład plam w rodkowej części autoradiogramu (na Rys. V.31. oznaczone czerwonym okręgiem). Zmiany te obejmowały także zanik dwóch charakterystycznych plam wskazanych na Rys. V.31 strzałką i mniejszą intensywność plam oznaczonych na Rys. V.31 niebieskim okręgiem. Dało się również zauważyć wzmocnienie intensywności kilku plam, wspomnianego wcześniej, rodkowego rejonu elektroforegramu. Stwierdzono poza tym, że autoradiogram uzyskany dla roliny wzrastającej w warunkach silnego zasolenia cechuje nieznaczna redukcja liczby plam położonych w górnym rejonie elu.

Analiza uzyskanych obrazów wykazała zatem, że czynniki egzogenne, takie jak stres osmotyczny, mogą prowadzić do zmian w profilu degradomu RNA.



Rysunek V.31. Przykładowe autoradiogramy uzyskane w wyniku rozdziału metod 2D-E frakcji RNA<120 z *A. thaliana* poddanych stresowi osmotycznemu (A) oraz ro lin kontrolnych, wzrastaj cych w standardowych warunkach (B). Opis szczegółowy w tek cie.

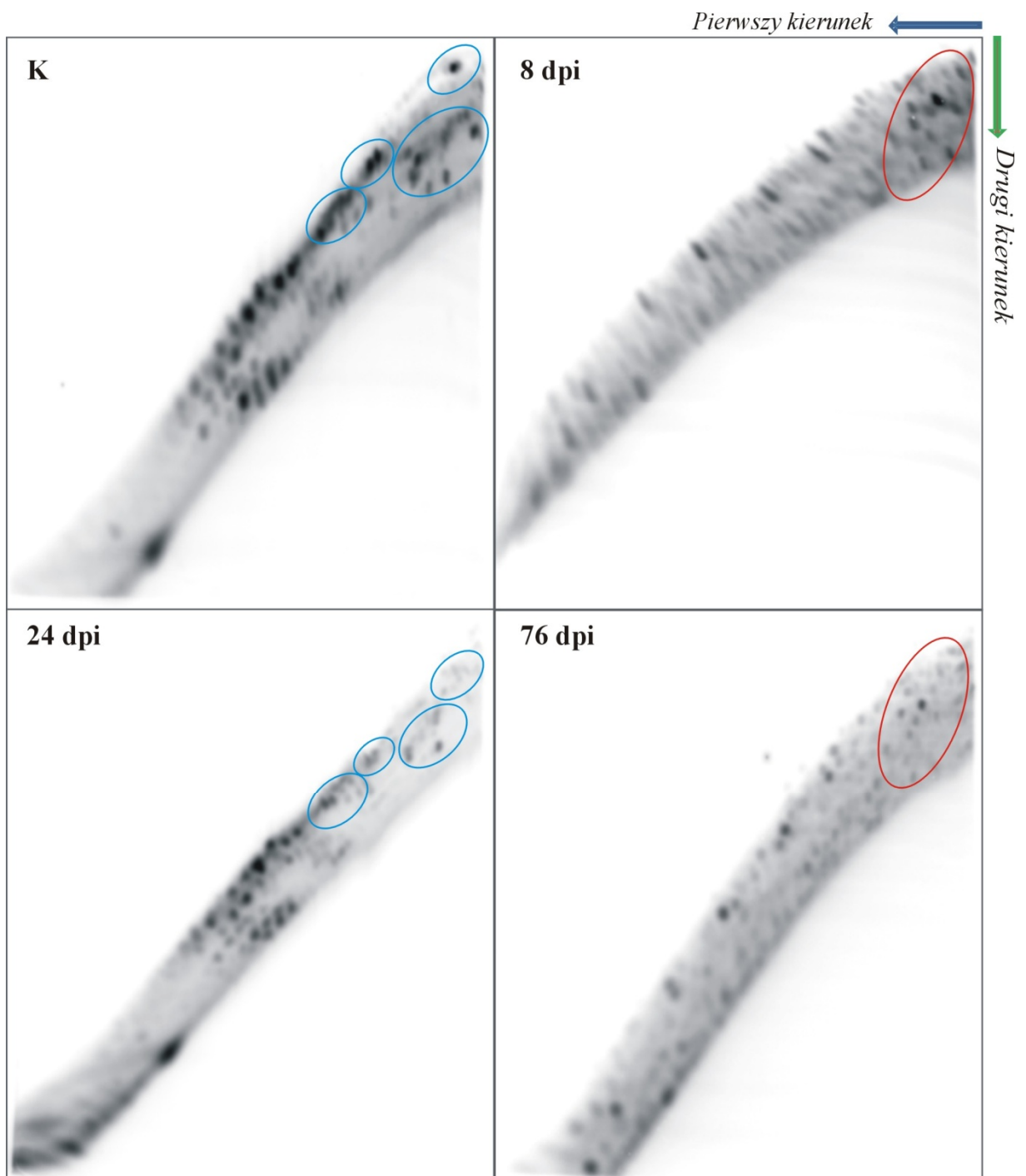
V.3. Analiza Zmian zachodz cych w degradomie RNA podczas procesów rozwojowych

Wyniki dotychczasowych analiz wskazywały, e degradom RNA mo e mie unikalny tkankowo-specyficzny charakter, gdy na jego skład wpływaj ró nego rodzaju czynniki endo- i egzogenne. Wszystkie przeprowadzone analizy dotyczyły jednak w pełni dojrzałych ro lin o ustabilizowanym metabolizmie, st d najprawdopodobniej obserwowane zmiany były do ograniczone. Aby zbada jak zmienia si degradom RNA podczas intensywnie zachodz cych procesów rozwojowych postanowiono wykorzysta jeden z układów modelowych stosowanych w tego typu analizach. S nim brodawki korzeniowe rozwijaj ce si podczas symbiozy ro lin motylkowatych z bakteriami wi cymi azot. Jako materiał badawczy wykorzystano nieinfekowane korzenie oraz brodawki korzeniowe łubinu ółtego *Lupinus luteus* odmiany Ventus. Tkank korzenia zebrano po trzech dniach od siewu, natomiast tkank brodawek 8, 24 i 76 dni po infekcji szczepem *Bradyrhizobium lupini* (Metody IV.2). Analogicznie jak w opisanych wcze niej przypadkach pozyskane z

korzenia i brodawek preparaty RNA<120 poddano analizie metod dwukierunkowej elektroforezy w elu PAA.

Ju wst pna, bardzo pobie na ocena uzyskanych autoradiogramów wykazała zaskakuj ce podobie stwo degradomu RNA z tkanki korzenia i z 24-dniowych brodawek (Rys. V.32. 8 dpi oraz 24 dpi). Na obu z łatwo ci mo na znale wspólne elementy, stanowi ce punkt odniesienia do poszukiwa innych mniej lub bardziej wyra nych ró nic. Jedn z nich jest z pewno ci ogólnie ni szy poziom intensywno ci plam obserwowany dla 24-dniowej brodawki szczególnie w rejonie oznaczonym na Rys. V.32 niebieskim okr giem. Z drugiej strony mo na dostrzec, e autoradiogramy uzyskane dla RNA izolowanych z 8-dniowych młodych i 76-dniowych starzej cych si brodawek znacznie odbiegaj od dwóch pozostałych (Rys. V.32. 8 dpi oraz 76 dpi). Tylko niektóre z plam wydaj si mie tutaj odpowiedniki na autoradiogramach uzyskanych dla nieinfekowanej tkanki korzenia i dojrzałej brodawki. Generalnie wyst puje na nich mała ilo bardzo intensywnych plam. Mo na jednak zauwa y pewne podobie stwo pomi dzy degradomami RNA charakterystycznymi dla pierwszego i ostatniego z analizowanych stadiów rozwojowych brodawek (brodawki 8- i 76-dniowe). Wyra ne ró nice wyst puj głównie w rejonie oznaczonym na V.32 czerwonym okr giem.

Przeprowadzona analiza wykazała, e wraz z osi ganiem przez komórki kolejnych etapów rozwojowych wyra nie zmienia si ich degradom RNA. Innymi słowy, ka demu stanowi przyporz dkowa mo na charakterystyczny zestaw cz steczek RNA o długo ci od 12 do 120 nt. Niestety ze wzgl du na brak znajomo ci pełnej sekwencji genomu łubinowego nie sposób było jednoznacznie okre li , jakie jest pochodzenie poszczególnych cz steczek.



Rysunek V.32. Przykładowe autoradiogramy uzyskane w wyniku rozdziału metod 2D-E frakcji $\text{RNA}_{<math>32</math>} z *L. luteus* izolowanej z: nieinfekowanej tkanki korzenia (K), brodawek korzeniowych 8 dni po infekcji *B. lupini* (8 dpi), brodawek korzeniowych 24 dni po infekcji *B. lupini* (24 dpi), 76 dni po infekcji *B. lupini* (76 dpi). Opis szczegółowy w tekście.$

VI. DYSKUSJA

Mimo niezwykłego postępu, jaki w drugiej połowie XX wieku dokonał się w obrębie nauk biologicznych, nasza wiedza na temat katabolizmu kwasów nukleinowych jest wciąż bardzo ograniczona. W przypadku kwasów rybonukleinowych zjawiskiem, które od wielu już lat skupiało uwagę badaczy, był tzw. recykling nukleotydów. Proces ten polega na ciągłym rozpadzie funkcjonalnych RNA do pojedynczych monomerów, dzięki czemu stale uzupełniana jest pula nukleotydów potrzebnych do syntezy nowych cząsteczek.

Podstawowym celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie była identyfikacja i wstępna charakterystyka produktów przejściowych, jakie potencjalnie mogą powstawać w trakcie procesu degradacji RNA w komórkach roślinnych. Uzyskane wyniki sugerują, iż degradacja RNA jest procesem uporządkowanym i powtarzalnym. W jej rezultacie generowana jest pula stabilnych cząsteczek, które akumulowane są w komórkach i mogą być wykorzystane jako specyficzne regulatory lub służyć jako biomarkery, zarówno przemian fizjologicznych, jak i procesów patologicznych zachodzących w organizmie roślinnym.

Z danych literaturowych wynika, iż w zależności od panujących warunków, różna jest dynamika rozpadu poszczególnych cząsteczek RNA. Można zatem powiedzieć, że w danych warunkach każda RNA charakteryzuje się specyficzną trwałością, przez co proces jego degradacji prowadzi zawsze do powstania ściśle określonych produktów przejściowych. Stosunkowo niską stabilnością charakteryzują się z reguły cząsteczki mRNA. Regulacja ich degradacji jest jednym z podstawowych mechanizmów kontrolujących ekspresję genów i determinujących poziom akumulacji białek. Za najtrwalsze uważane są rRNA i tRNA. Jedynie niebrano pod uwagę procesów, w których eliminowane są cząsteczki nieprawidłowo zsyntetyzowane (kontrola jakości RNA), wówczas można stwierdzić, że RNA te są degradowane tylko w wyjątkowych sytuacjach np. niedoboru fosforu, azotu, węgla czy magnezu (Deutscher, 2003; Deutscher, 2006). W trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy, pojawiły się pierwsze doniesienia na temat akumulacji połowicznych produktów degradacji tRNA (30-35 nt) oraz krótkich produktów rozpadu rRNA (Lee i Collins, 2005; Johl, 2007; Haiser, 2008; Li, 2008; Thompson, 2008; Zhang, 2009). Fenomen ten został zaobserwowany zarówno w przypadku organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych, dotyczy bakterii, grzybów, roślin, a także zwierząt (Tab. VI.1) (Li i Zhou, 2009). Nadal jednak nieznaną pozostają przyczyny, dla których komórki akumulują produkty degradacji kwasów rybonukleinowych. Jak dotąd, nie wyjaśniono również jak mogą one pełnić rolę. Postuluje się, że produkty degradacji rRNA i tRNA mogą funkcjonować jako cząsteczki sygnałowe w procesach rozwojowych lub w oddziaływaniach pomiędzy organizmem a

otaczają cym go rodowiskiem. Inne hipotezy zakładają, i mog one by zaangażowane w negatywn regulację ekspresji genów poprzez bezpo redni inhibicję translacji, w sposób odpowiadający innym małym regulatorowym RNA, lub te w sposób po redni, ograniczając ilo funkcjonalnych cz steczek potrzebnych do biosyntezy białka (Thompson, 2008; Zhang, 2009; Li i Zhou, 2009). Dogł bna analiza tego niezwykle ciekawego zjawiska z pewno ci przyczyni si do lepszego poznania podstawowych procesów zachodz cych w komórce.

Tabela V.1. Znane przykłady akumulacji produktów degradacji tRNA u ró nych organizmów (Li i Zhou, 2009).

Organizm	Warunki indukuj ce ci cie	Ci te izotopy tRNA	Pozycja ci cia	Długo produktu w nt	Enzym	Proponowana funkcja
<i>E. coli</i>	indukcja odpowiedzi SOS u <i>E. coli</i>	tRNA-Tyr, -His, -Asn, -Asp tRNA-Arg	34-35 38-39	34-37	colicyna E5 colicyna D	hamowanie biosyntezy białka, indukcja apoptozy
<i>T. thermophila</i>	niedobór aminokwasów	wszystkie tRNA	p tła antykodonu	30-35	Nieznany	eliminacja nieaminoacylowanych tRNA, cz steczki sygnałne
<i>S. coelicolor</i>	ró nicowanie komórek	wszystkie tRNA	p tła antykodonu	30-35	Nieznany	cz steczki sygnałne w procesach rozwojowych
<i>A. fumigatus</i>	ró nicowanie komórek	wszystkie tRNA za wyjątkiem tRNA-Met, -Trp i -Asp	rejon przyległy do antykodonu od strony 3'	brak informacji	Nieznany	hamowanie biosyntezy białka
ssaczce linie komórkowe	ró ne stesy	brak informacji	p tła antykodonu	35-37	angiogenina	odpowied na stres komórkowy
dro d e, ro liny, ludzkie linie komórkowe	stres oksydacyjny	tRNA-Arg, -Asp, -Gln, -Glu, Gly, -Ile, -Leu, -Lys, -Ser, -Thr, -Met	p tła antykodonu i rejon przyległy	~40	Nieznany	cz steczki sygnałne, inhibicja translacji
<i>G. lamblia</i>	ró ne stesy	wszystkie tRNA	rejon przyległy do antykodonu od strony 5'	~46-47	Nieznany	negatywna regulacja ekspresji genów

VI.1. Wst pne badania metodologiczne

Technika dwukierunkowej elektroforezy okazała si bardzo obiecuj cym narz dziem badawczym umo liwiaj cym wst pn charakterystyk wybranej frakcji RNA (RNA<120). Na podstawie analiz modelowych mieszaniny zło onej z czterech syntetycznych

oligorybonukleotydów, mo na było s dzi , e najlepszy rozdział uzyskiwany jest przy zastosowaniu eli natywnych. W istocie, najbardziej stabilne konformery były wówczas wyra nie rozseparowane. Dodatkowo jednak sygnał ulegał znacznemu rozmyciu, najprawdopodobniej w wyniku wyst powania licznych mniej stabilnych konformerów. Obserwowany dynamizm konformacyjny krótkich cz steczek RNA wydawał si by bez znaczenia w przypadku analizy czterech modelowych oligorybonukleotydów (Rys. V.3). Jednak e znacznie utrudniał analiz realnych próbek wyizolowanych z ro lin (Rys. V.4).

Na podstawie wniosków wyływaj cych z przeprowadzonych bada testowych (Wyniki V.1.2.1) zdecydowano, aby RNA podda analizie za pomoc dwukierunkowej elektroforezy w cz ciowo-denaturuj cych elach PAA. Zastosowanie takich warunków rozdziału zapewnia stosunkowo dobr separacj cz steczek o takiej samej długo ci, lecz o ró nym składzie nukleotydowym (ró nej masie cz steczkowej). Dodatkowo w warunkach cz ciowo-denaturuj cych wyst powa mog tylko najstabilniejsze konformery, natomiast struktury mniej stabilne ulegaj rozbiciu. Pozwala to unikn nadmiernego rozmycia sygnałów (plam). Fakt ten wydaje si mie szczególne znaczenie w sytuacji, kiedy analizie poddawana jest cała komórkowa populacja cz steczek RNA <120 .

VI.2. Wst pna analiza krótkich RNA wyst puj cych w komórkach ro linnych

W kolejnym etapie bada postanowiono oszacowa polimorfizm puli krótkich RNA wyst puj cych w wybranym organie modelowej ro liny *A. thaliana*. W tym celu przeprowadzono wiele niezale nych analiz 2D-E frakcji RNA <120 izolowanych z li ci. Stwierdzono, i charakteryzuje si ona stabilnym składem zarówno pod wzgl dem jako ciowym, jak i ilo ciowym. Nast pnie w analogiczny sposób próbowano ustali , w jakim stopniu frakcja RNA <120 jest tkankowo specyficzna. W badaniach tych wykorzystano preparaty izolowane z li ci, korzeni oraz kwiatów *A. thaliana*. Wst pna, bardzo powierzchowna analiza uzyskanych autoradiogramów wskazywała na stosunkowo du e podobie stwo pomi dzy poszczególnymi próbkami. Dopiero bardziej szczegółowe ich porównanie pozwoliło zidentyfikowa ró nice zarówno jako ciowe tzn. obecno plam unikalnych i charakterystycznych wył cznie dla danego organu, jak i ilo ciowe, czyli wygaszenie b d wzmocnienie sygnałów pochodz cych najprawdopodobniej od identycznych cz steczek RNA. Analizowane próbki RNA pochodziły z wyspecjalizowanych organów pełni cych odmienne funkcje biologiczne, mo na było zatem przyj , i transkryptom tych komórek nie jest jednakowy. Na przykład, szereg reakcji i procesów fizjologicznych

zależnych od światła, w tym fotosynteza, powinno determinować unikalny charakter frakcji RNA<120 izolowanej z liści. Nie wydaje się jednak, aby procesy te w zasadniczy sposób wpływały na skład badanych preparatów. Na podstawie uzyskanych wyników należałoby więc sądzić, że dająca się wykryć pula czeczek pochodzi w swej zasadniczej części z tzw. konstytutywnych RNA. Jest sprawą oczywistą, że w różnych organach mogą pojawiać się specyficzne dla nich czeczki RNA, jednak podstawowe elementy transkryptomu (tRNA, rRNA), a tym samym produkty ich degradacji, akumulowane są na zbliżonym poziomie zarówno w częściach podziemnych, jak i nadziemnych rośliny. Zastosowana metoda badawcza umożliwiała detekcję jedynie tych czeczek, które występowały w odpowiednio wysokim stężeniu. Zaobserwowane profile akumulacji krótkich RNA odzwierciedlały zatem podstawowy stan fizjologiczny całego organizmu. Zdecydowana większość specyficznych RNA powstających tylko w niewielkiej liczbie kopii, była najprawdopodobniej niewykrywana. Nie może więc dziwić fakt, iż najwięcej różnic wykazywał preparat wyizolowany z kwiatów, czyli organów wyspecjalizowanych w rozmnażaniu generatywnym.

Na podstawie przeprowadzonych badań można było stwierdzić, iż skład ilościowy oraz jakościowy analizowanej puli czeczek RNA o długości poniżej 120 nt nie wykazuje znaczących fluktuacji, dodatkowo jest w pewnym zakresie organo-specyficzny. Jeżeli założymy, że znaczna część tych czeczek pochodzi z rozkładu większych jednostek transkrypcyjnych, wówczas degradom RNA może być traktowany jako potencjalne źródło biomarkerów.

VI.3. Identyfikacja czeczek tworzących degradom RNA

Aby uzyskać więcej informacji na temat czeczek RNA obserwowanych podczas dwukierunkowej elektroforezy, skonstruowano dwie biblioteki cDNA. Do otrzymania pierwszej z nich, tzw. biblioteki RNA18-73, użyto wszystkich czeczek (wyizolowanych z liści *A. thaliana*) o długości od 18 do 73 nukleotydów. Druga, zwana biblioteką RNA70, stworzona została w oparciu o 70 wyizolowanych z elu czeczek, charakteryzujących się najwyższą akumulacją. Następnie sklonowano i poznano sekwencje 161 różnych czeczek pochodzących z biblioteki RNA18-73 oraz 66 różnych czeczek z biblioteki RNA70. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, że za produkty degradacji uznano 98% (157) czeczek zidentyfikowanych w obrębie biblioteki RNA18-73 i 90% (60) czeczek zidentyfikowanych w obrębie biblioteki RNA70. Ponad 80% czeczek biblioteki RNA70 oraz 65% czeczek biblioteki RNA18-73 to produkty degradacji rRNA i tRNA. W obu przypadkach najliczniejszą frakcję stanowiły produkty degradacji tRNA (odpowiednio

48% i 35% wszystkich zidentyfikowanych cz. steczek). Pozostałe cz. steczki odpowiadały produktom degradacji mRNA, małych RNA, w tym prekursorów miRNA, a tak e, co ciekawe, niezidentyfikowanych dot d cz. steczek transkrybowanych prawdopodobnie z rejonów klasyfikowanych jako DNA mi dzygenowe. Te ostatnie stanowiły zaledwie 3% degradantów zidentyfikowanych w bibliotece RNA70 i a 18% degradantów wyłowionych z biblioteki RNA18-73. Udział procentowy poszczególnych klas RNA różnił obie biblioteki w sposób znaczny w przypadku produktów degradacji tRNA i rejonów mi dzygenowych. W bibliotece RNA18-73 stosunkowo mniejszy udział produktów degradacji tRNA rekompensowany był większą liczbą cz. steczek pochodzących z rejonów mi dzygenowych. W przypadku biblioteki RNA70 zaobserwowano natomiast sytuację odwrotną. Może to świadczy o tym, iż produkty transkrypcji DNA mi dzygenowego powstają w komórkach w niewielkiej liczbie kopii i w większym stopniu akumulowane na poziomie uniemożliwiającej detekcję za pomocą dwukierunkowej elektroforezy. Ponieważ biblioteka RNA70 powstała na bazie wytypowanych cz. steczek RNA o stosunkowo wysokim poziomie akumulacji, zidentyfikowano zaledwie kilka procent cz. steczek o takim pochodzeniu. Biblioteka RNA18-73 dostarcza natomiast informacji o stanie totalnego degradomu RNA komórki. Analiza jej składu pozwala stwierdzić, iż istotną częścią tej biblioteki stanowi cz. steczki występujące w komórce na niskim i bardzo niskim poziomie.

Podczas przygotowania biblioteki RNA18-73 zastosowano dwa różne podejścia klonowania cz. steczek RNA. W pierwszym podejściu, do obu końców cz. steczek RNA przyłączono krótkie oligomery o zaprojektowanej sekwencji. Drugie podejście pozwalało uzyskać sekwencje cDNA z pominięciem reakcji przyłączania oligomeru do końca 5' RNA. Okazało się, że w przypadku zastosowania pierwszej z metod, 50% analizowanych sekwencji odpowiadało tRNA, a 24% pochodnym rejonów mi dzygenowych. Preferencyjne klonowanie obu tych klas cz. steczek szło w parze ze stosunkowo niewielkim udziałem produktów degradacji rRNA (13%). Wprowadzenie drugiej z metod klonowania spowodowało zmniejszenie udziału cz. steczek zaklasyfikowanych jako produkty degradacji tRNA i transkrypty mi dzygenowe do odpowiednio 29% i 13%. Sytuacji takiej towarzyszyło niemal trzykrotne zwiększenie liczebności frakcji produktów degradacji rRNA. Ponieważ druga z metod zakładała pominięcie reakcji przyłączania oligomeru do końca 5' końca RNA, możliwe stało się klonowanie cz. steczek bez względu na obecność czy brak grupy fosforanowej. Może to sugerować, że większą część poddanych klonowaniu fragmentów rRNA, w odróżnieniu od produktów degradacji tRNA, nie posiada grupy fosforanowej na końcu 5', przez co nie ulega połączeniu z syntetycznym oligonukleotydem. Produkty te powstały

najprawdopodobniej na skutek procesów rozpadu prowadzących do uwolnienia cząstek z wolnych grup hydroksylowych na końcu 5' i cyklicznym monofosforanem na końcu 3'.

Większość (55%) cząstek biblioteki RNA70 posiadała swoje odpowiedniki porównując do cząstek biblioteki RNA18-73. Okazuje się zatem, że degradacja RNA może być badana niezależnie kilkoma metodami, uzyskując przy tym wiarygodne wyniki. Cząstki obecne w obu bibliotekach są równie dowodem na istnienie uniwersalnych i bardzo specyficznych mechanizmów degradacji. Co więcej, można sądzić, że akumulacja cząstek wspólnych dla obu bibliotek jest w pewien sposób uprzywilejowana, a w komórce istnieje zapotrzebowanie na konkretne produkty degradacji. Biblioteka RNA18-73, jak już wspomniano, odpowiada całkowitej degradacji RNA komórki. Dzięki temu analiza ilościowa poszczególnych jej elementów może również dostarczyć wartościowych informacji o nagromadzeniu konkretnych fragmentów RNA w komórce. Większość ze zidentyfikowanych cząstek biblioteki RNA18-73 wyizolowano jednokrotnie. Istnieją również takie, które sklonowano wielokrotnie (od dwóch do kilkunastu niezależnych powtórzeń). Do najczęściej występujących zaliczyć można: fragment 25S rRNA, 18S rRNA, 5,8S rRNA (po kilkanaście niezależnych powtórzeń) oraz 2 fragmenty tRNA-Gly i fragment tRNA-Trp (7-9 niezależnych powtórzeń). Spośród frakcji małych RNA na szczególne wyróżnienie zasługują dwie cząstki, które zidentyfikowano odpowiednio 38- i 11-krotnie. Często identyfikacji niektórych klonów może dodatkowo ulec powiększeniu, jeśli weźmie się pod uwagę występowanie różnych wariantów danej cząstki (warianty różniące się długością). Widawiec, że również pod względem ilościowym, degradacja RNA stanowi bardzo różnorodny pul cząstek. W przypadku biblioteki RNA70, analiza ilościowa była nieuzasadniona, gdy matryce do uzyskania biblioteki łączyono, „uśredniając” zawartość poszczególnych cząstek.

Uważa się, że 80% całkowitego RNA przeciwnej komórki stanowi rRNA, 10-15% to tRNA a 5% to mRNA. Udział małych regulatorowych RNA w puli całkowitego RNA komórki jest stosunkowo niewielki. Pomimo, mimo zróżnicowania poziomu ich ekspresji, m. in. w zależności od tkanki, jej aktywności biologicznej lub wieku organizmu, średnia zawartość miRNA w transkryptomie wynosi około 0,01% (ródło: *mirVana*TM Labelling Kit, Ambion). Analiza bioinformatyczna cząstek wyizolowanych z obu bibliotek wykazała tymczasem, że dominującą frakcją degradatu są pochodne tRNA (a do 48% wszystkich cząstek biblioteki RNA70). Produkty degradacji rRNA stanowią drugo co do wielkości frakcją degradatu 30-37%. Można zatem powiedzieć, że skład degradatu RNA nie odzwierciedla stosunków ilościowych pomiędzy poszczególnymi klasami RNA występującymi w komórce. Obserwowana zmiana proporcji przemawia również za tym, że badane produkty degradacji

nie powstały na skutek przypadkowego rozpadu cz. steczek, na przykład podczas ich izolacji. W przeciwnym razie, należałoby spodziewać się głównie produktów degradacji dominującego komponentu, a więc pochodnych cz. steczek rRNA. Wśród analizowanego zbioru cz. steczek, będących produktami degradacji większych funkcjonalnych transkryptów, znajduje się również liczna 7-8% frakcja cz. steczek związanych z biogenezą małych niekodujących RNA. Udział tej frakcji w populacji cz. steczek o długości nie przekraczającej 120 nt jest więc kilkaset razy większy w porównaniu do udziału w totalnym RNA komórki. Wyjątkiem są natomiast produkty degradacji mRNA. W ich przypadku zaobserwowano zgodnie pomiędzy kilkuprocentowym udziałem w populacji degradatu oraz totalnym RNA. Należy również dodać, że przy obliczaniu procentowych udziałów poszczególnych typów RNA w transkryptomie nie uwzględniono tej jego części, która powstaje na bazie rejonów międzygenowych.

VI.4. Funkcja zidentyfikowanych degradantów RNA

Obserwacja, że w komórkach dochodzi do akumulacji stabilnych produktów po rednich degradacji cz. steczek rRNA i tRNA znalazła w ostatnich latach poparcie w danych literaturowych. Nie wiadomo natomiast, jaka jest funkcja tych cz. steczek i jakie mechanizmy odpowiadają za ich powstanie. Zarówno tRNA, jak i rRNA przyjmuje się za cz. steczki stabilne, ulegające rozkładowi jedynie w szczególnych warunkach. Rybosomy i ich komponenty ulegają degradacji np. podczas ograniczonego dostępu do składników odżywczych. W ten sposób komórka korzysta z rezerwuaru niezbadanych do użytku makroelementów. Czynnikiem faworyzującym degradację rybosomów jest dysocjacja podjednostek. Z badań struktury krystalicznej tych makromolekuł wiadomo, że duża cz. rRNA eksponowana jest właśnie na powierzchni styku obu podjednostek rybosomu. Stąd dysocjacja podjednostek odsłania rejon wrażliwy na działanie endo- i egzonukleaz (Zundel, 2009). W ramach niniejszej pracy poddano analizie *in silico* 2 fragmenty 16S rRNA i 1 fragment 23S rRNA, lokujące w obrębie znanego modelu rybosomu bakteryjnego *Thermus thermophilus* (Selmer 2006). Oba fragmenty, które odpowiadają produktom degradacji 16S rRNA usytuowane są odpowiednio przy końcu 3' i 5' cz. steczki pełnej długości, natomiast produkt degradacji 23S rRNA odpowiada w przybliżeniu środkowej części cz. steczki. Okazało się, że wszystkie one znajdują się właśnie na powierzchni styku małej i dużej podjednostki rybosomu. Z poczynionych obserwacji wynika również, że analizowane rejonry rRNA położone są w pobliżu centrum biosyntezy białka.

Z ogólnych informacji na temat budowy i funkcji rybosomu bakteryjnego wynika, że jedna z domen 16S rRNA tzw. domena 3' *minor* wraz z 4 helisami, centralnym pseudowzłosem oraz 3' i 5' końcami cząsteczki tworzą centrum dekodujące odpowiedzialne za translokację mRNA i tRNA oraz kontrolę wierności oddziaływań kodon-antykodeon (Bkowska, 2005). Wiadomo również, że w pobliżu końca 3' prokariotycznych 16S rRNA znajduje się sekwencja anty-Shine-Dalgarno odpowiedzialna za wiązanie położonego powyżej kodonu start, komplementarnego regionu mRNA (sekwencja Shine-Dalgarno) (Bkowska, 2005). W ten sposób dochodzi do inicjacji oddziaływań rybosom-mRNA i w konsekwencji do rozpoczęcia translacji. Eukariotycznym ekwiwalentem sekwencji Shine-Dalgarno jest motyw mRNA zwany sekwencją Kozak. Fragment odpowiadający produktowi degradacji 23S rRNA nie obejmuje, co prawda, pozycji o aktywności transferazy peptydylowej (A2486), jednak z racji swego położenia z pewnością odgrywa znaczącą rolę w procesach biosyntezy białka. Wydaje się zatem, że przynajmniej niektóre badane produkty degradacji rRNA stanowią funkcjonalnie bardzo istotne fragmenty rybosomu. Być może wymuszona, w pewnych warunkach, degradacja rybosomu rozpoczyna się właśnie od dysocjacji jego podjednostek i usunięcia z kompleksu jako pierwszych, tych fragmentów rRNA, które pełni istotne funkcje. Uszkodzone w ten sposób podjednostki rybosomu nie mogą podlegać reasocjacji, w skutek czego następuje ich stopniowy rozkład. Nie wiadomo jednak, jakie czynniki biorą udział w tym procesie. Z danych literaturowych wynika, że niskie stężenie jonów magnezu faworyzuje dysocjację podjednostek rybosomu i tym samym ich sukcesywną degradację. Sugeruje się, że w początkowych etapach degradacji biorą udział enzymy z klasy endonukleaz. Jednak obecność inhibitorów transkrypcji, takich, jak rifampicyna, nie zapobiega degradacji rybosomów w głodujących komórkach. Stąd wniosek, że proces ten nie wymaga zaangażowania jakichś specyficznych białek co musiałoby wiązać się z wcześniejszą aktywacją kodujących je genów (Zundel, 2009).

Z przeprowadzonych analiz produktów degradacji rRNA wynika, że pochodne 25S rRNA i 18S rRNA stanowią odpowiednio 44% i 37% wszystkich klonów zidentyfikowanych jako fragmenty rRNA. Udział produktów degradacji pozostałych rRNA w tej frakcji degradatu jest niewielki i wynosi od 5% do 2%. Prawdopodobnie to z racji swych rozmiarów oraz powszechnego występowania na terenie cytoplazmy, cząsteczki 25S rRNA i 18S rRNA są źródłem stosunkowo dużej liczby degradantów. Z modeli struktury drugorzędowej, uzyskanych dla tych cząsteczek za pomocą programu MFOLD, wynika, że produkty degradacji mogą być uwalniane praktycznie z każdego regionu rRNA. Czynniki degradacji powstaje najprawdopodobniej na skutek odcięcia pętli apikalnych z

funkcjonalnych cz steczek, natomiast inne mog powstawa z jednego ramienia długich odcinków dwuniciowych. Fakt, i zaobserwowano niewiele produktów degradacji rRNA pochodzenia organellowego mo e wiadczy o odmiennych mechanizmach degradacji w cytoplazmie oraz w plastydach czy mitochondriach.

Co ciekawe, prawie wszystkie produkty degradacji zaklasyfikowane jako pochodne rRNA mogły w rzeczywisto ci powsta z kilku ró nych cz steczek. W trakcie analizy tej frakcji degradomu, identyfikowano zwykle dwa lub wi cej prekursorów wykazuj cych równie dobre dopasowanie. Obok rRNA były to najcz cieej mRNA lub małe RNA. Wi kszo z tych mRNA stanowi matryc do syntezy hipotetycznych białek o niepoznanej funkcji, inne to mRNA: białka z rodziny metalotionein, syntetazy glutationu, czynnika transkrypcyjnego i czynnika naprawy DNA. Metalotioneiny to białka odpowiedzialne za kumulowanie niezbdnych pierwiastków ladowych, głównie cynku i miedzi oraz toksycznych jonów metali ci kich, np. kadmu. Zarówno metalotioneiny, jak i glutation, syntetyzowany przy udziale syntetazy glutationu, zaliczane s do silnych antyoksydantów (Baranowska-Morek, 2003). Okazuje si zatem, e przynajmniej w kilku przypadkach przeprowadzona analiza dotyczy RNA koduj cych białka zaangażowane w ochron komórki przed wpływem szkodliwych czynników.

Bardzo interesuj ce wydaje si pytanie, dlaczego tak liczna frakcja degradomu RNA mo e powstawa z kilku ró nych transkryptów. W wyja nieniu tego problemu pomocne mog okaza si badania nad endonukleaz tRNA Z. Enzym ten, uczestniczy w dojrzewaniu ko ca 3' tRNA. Z doniesie literaturowych wynika, e ludzka cytozolowa tRNaza Z funkcjonuje jako kompleks rybonukleoproteinowy zło ony z endonukleazy i tzw. cz steczki naprowadzaj cej sgRNA (ang. *small guide RNA*). Co ciekawe, udowodniono, e sgRNA tRNazy Z to przede wszystkim 5'-połowy tRNA i fragmenty 28S rRNA. Rola sgRNA polega na oddziaływaniu z komplementarn sekwencj w docelowej cz steczce RNA, w taki sposób, aby doszło do odtworzenia struktury drugorz dowej pre-tRNA lub rRNA. Układ ten rozpoznawany jest nast pnie przez nukleaz , która przeprowadza ci cie docelowej cz steczki RNA w ci le okre lonym miejscu. Istniej przesłanki sugeruj ce, e tRNaza Z mo e uczestniczy w regulacji ekspresji genów. Poparciem dla tej tezy s badania *in silico* i identyfikacja 432 cz steczek mRNA, których poziom mógłby by regulowany z udziałem 5' połowy tRNA-Glu, jako sgRNA. Pojawiły si równie eksperymentalne dowody na to, i 5' połowy tRNA-Glu i fragmenty 28S rRNA umo liwiaj tRNazie Z przeci cie mRNA fosfatazy białkowej F1 (PPMF1) i mRNA ci kiego ła cucha dyneiny (DYNC1H1) (Elbarbary, 2009).

Być może to właśnie nieduże zapotrzebowanie na cząsteczki kluczowe dla tRNazy Z powoduje, że one pozyskiwane z kilku różnych źródeł i preferencyjnie akumulowane. Zaprzecza temu wydaje się jednak fakt, iż pochodzenie produktów degradacji tRNA stanowi cych najliczniejszą frakcję degradatu RNA, określono w sposób jednoznaczny.

Jak już wcześniej wspomniano, w ostatnich latach ukazało się kilka publikacji poświęconych zjawisku akumulacji produktów degradacji tRNA. We wszystkich tych przypadkach stwierdzano, że frakcja degradantów tej klasy cząsteczek RNA jest szczególnie liczna. Cząsteczki tRNA są stosunkowo nieduże, posiadają stabilną i dobrze zdefiniowaną strukturę, stąd tę kwestię analiza produktów ich rozpadu nie przysparza większych trudności. Do czynników, które indukują degradację tRNA zalicza się przede wszystkim niedobór składników odżywczych, np. aminokwasów, bądź stres oksydacyjny. Wielu naukowców tłumaczy zaistniałą sytuację ograniczeniem procesu translacji. Brak aminokwasów w komórce prowadzi bowiem do zmniejszenia liczby wolnych tRNA, a te z kolei stają się substratem dla enzymów nukleolitycznych. Istnieją jednak dowody, iż proces ten jest znacznie bardziej złożony i nie opiera się wyłącznie na mechanizmach kontroli jakości niefunkcyjnych tRNA. Przemawia za tym fakt, iż mutanty drożdży, wykazujące zaburzenia procesów dojrzewania tRNA, akumulują połówki tych cząsteczek, na poziomie zbliżonym do obserwowanego u szczepu dzikiego. Wiadomo również, że degradacja tRNA o nieprawidłowym wzorze modyfikacji zachodzi z udziałem egzonukleaz 5' (Thompson, 2008; Li, 2009).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy dowodzą, iż *A. thaliana* wzrastająca w normalnych warunkach akumuluje w swoich komórkach różnej długości produkty degradacji tRNA. Stwierdzono obecność produktów degradacji wszystkich typów cząsteczek tRNA dekodujących glutaminę. Może to sugerować, że mechanizmy odpowiedzialne za ich powstanie są uniwersalne, jeżeli nie dla wszystkich, to przynajmniej dla olbrzymiej większości różnych tRNA. Z racji tego, że skład degradatu tRNA cytoplazmatycznych różni się od organellowego można przypuszczać, że selekcja cząsteczek przeznaczonych do degradacji zachodzi inaczej w różnych kompartmentach komórki. Jeżeli przyjmie się, iż analizowane fragmenty pełnią jakąś funkcję, wówczas w zależności od kompartmentu, inne może być zapotrzebowanie na poszczególne produkty degradacji. Należy zaznaczyć, że zidentyfikowano zaledwie jeden fragment tRNA pochodzenia mitochondrialnego. Może to sugerować, że badane zjawisko dotyczy tego organelum w bardzo niewielkim stopniu bądź wcale. Wśród degradantów pochodzenia cytoplazmatycznego znajdują się pochodne a 7 różnych tRNA dekodujących argininę. Zidentyfikowano również

produkty degradacji 4 różnych tRNA-Cys, tRNA-Gly oraz tRNA-Glu. Dodatkowo fragmenty tRNA-Gly i tRNA-Trp należą do najczęściej występujących cząstek tej frakcji degradatu. Podczas gdy aminokwasy dekodowane przez tRNA-Gly i tRNA-Glu są często wykorzystywane podczas syntezy białek, cysteina i tryptofan zalicza się do aminokwasów występujących stosunkowo rzadko. Trudno zatem jednoznacznie stwierdzić, czy analizowane zjawisko dotyczy degradacji tRNA występujących w nadmiarze a rzadko wykorzystywanych, czy te rozpadają się te cząstki, których jest w komórce najmniej. Bardzo interesującym wydaje się również fakt, iż nie zawsze produkty degradacji tRNA pochodzą z cząstek kodowanych przez największą liczbę genów. W jednej z bibliotek nie znaleziono cząstki, która odpowiadałaby tRNA-Ser o antykodonie AGA, kodowanemu w genomie jadowym przez 37 genów. Zaobserwowano natomiast fragmenty synonimicznych tRNA-Ser, dla których znanych jest zaledwie kilka genów. Podobną sytuację zanotowano w przypadku tRNA dekodujących prolinę i walinę. Zwraca uwagę również fakt, iż geny wiążące zidentyfikowanych cząstek znajdują się na chromosomach 5 (50%) i 2 (23%). Akumulowane produkty degradacji nie zawsze pochodzą z tych cząstek w obrębie jednego typu, których antykonon jest najczęściej wykorzystywany spośród wszystkich kodonów synonimicznych. Okazuje się, że tRNA o antykononach wykorzystywanych przez maszynę translacyjną z cząstotliwością mniejszą niż 1%, również mogą być źródłem produktów degradacji. Doskonałym tego przykładem są trzy spośród pięciu analizowanych tRNA argininowych.

W generowaniu puli cząstek pochodzenia organelowego dominującą rolę odgrywają inne typy tRNA: tRNA-Leu, tRNA-Ile, tRNA-Val. Wszystkie one charakteryzują się stosunkowo cząstym wykorzystaniem podczas biosyntezy białek. Może to sugerować, że w przypadku degradatu plastydowego akumulowane są produkty degradacji najpowszechniej występujących cząstek tRNA.

W odróżnieniu od autorów cytowanych wcześniej publikacji, analizujących głównie cząstki powstałe na skutek zerwania wiązania internukleotydowego w obrębie pętli antykononowej, w ramach niniejszej pracy zbadano całkowitą pulę degradantów tRNA. Okazało się, że najliczniej występującymi fragmentami są cząstki reprezentujące 4 wiązki (39% frakcji cytoplazmatycznej i 50% frakcji organelowej) oraz połowy 3' tRNA (35% frakcji cytoplazmatycznej i 22% frakcji organelowej). Bardzo interesującym wydaje się fakt, iż wszystkie analizowane produkty degradacji tRNA argininowych odpowiadały cząstce 3'-koncej, podobnie w przypadku 4 z 5 tRNA-Leu oraz 4 z 5 tRNA-Glu. Połowy zawierające koniec 5', będą fragmenty odpowiadające 1 wiązce występującej w

analizowanej puli degradantów znacznie rzadziej (sumarycznie 13% frakcji cytoplazmatycznej i 17% frakcji organellowej). Pozostała część degradantów (13% frakcji cytoplazmatycznej, 12% frakcji organellowej) obejmowała cząsteczki wiązane w połowę, bądź odpowiadające wiartkom 2 i 3 tRNA. Zaledwie w przypadku 6 analizowanych tRNA obserwowano akumulację obu części tej samej cząsteczki. Może to sugerować, że czynnikiem odpowiedzialnym za ich powstanie jest enzym z klasy endonukleaz. Z doniesień literaturowych wynika, że istnieje przynajmniej kilka rybonukleaz, które specyficznie tną tRNA. Kolicyna D jest endonukleazą dokonującą cięcia w obrębie pętli antykodonowej czterech synonimicznych tRNA dekodujących arginin. W efekcie następuje spowolnienie biosyntezy białka i śmierć komórki. Kolicyna E5 wstrzymuje natomiast translację poprzez cięcie w pętli antykodonowej tRNA dekodujących tyrozyn, histydyn, asparagin i kwas asparaginianowy. Obie kolicyny nie wykazują istotnego stopnia homologii. Różni je również mechanizm rozpoznawania substratu i sposób w jaki katalizują reakcję rozerwania wiązania internukleotydowego (Tomita, 2000). Mniej prawdopodobne wydaje się, aby akumulacja degradantów miała związek z egzonukleolitycznym strawieniem jednej połówki tRNA i uwolnieniem drugiej. Niewykluczone, że zerwanie wiązania fosfodiesterowego w obrębie obszarów jednoniowych, przede wszystkim w pętli antykodonowej, odbywa się z udziałem niespecyficznych nukleaz bądź pod wpływem czynników fizycznych. Faktem jest, iż komórki zmuszone są utrzymywać równowagę poziomu tRNA. Nadekspresja tych cząsteczek może być niebezpieczna dla organizmu. Udokumentowano jej związek m. in. z procesem nowotworzenia (Zhou, 2009).

74% produktów degradacji pochodzących z końca 3' tRNA posiadało sekwencję CCA. Jest to dowód, że pochodzą one z rozpadu w pełni dojrzałych cząsteczek. To właśnie m. in. obecność sekwencji CCA i aminoacylacja czyni cząsteczki tRNA bardziej stabilnymi. Taka sytuacja wydaje się uzasadniana, dlatego pośród wszystkich produktów degradacji tRNA dominują cząsteczki odpowiadające fragmentom z końca 3'.

Przypuszcza się, co do funkcji badanych cząsteczek, jest kilka. Jak już wspomniano, połowy 5' tRNA lub cząsteczki skrócone o niewielki fragment z końca 3' mogą funkcjonować jako naprowadzające RNA (sgRNA) dla pewnych endonukleaz. Ponieważ degradanty pochodzące z końca 5' cząsteczek tRNA stanowi zaledwie kilkanaście procent tej frakcji degradatów, funkcję taką może pełnić jedynie niewielka część degradantów. Wskazówki mogą być również specyficzne, zależne od tRNA, mechanizmy regulacji ekspresji genów. U *Bacillus subtilis* nieaminoacylowane tRNA są np. bezpośrednimi regulatorami transkrypcji genów syntezy aminokwasów. W specyficznych warunkach,

antykonon nieaminoacylowanego tRNA mo e oddziaływa z DNA (w rejonie koduj cym 5' UTR genów zwi zanych z biosyntezy i transportem aminokwasów), podczas gdy wolny koniec 3' ramienia akceptorowego stabilizuje struktur antyterminatora transkrypcji. Cho opisany przykład dotyczy organizmu prokariotycznego, mo liwe, e taki system regulacji ma charakter uniwersalny. W oddziaływanie z DNA zaangażowana jest p tła antykononowa i wolny koniec 3' cz steczki mo liwe wi c, e analogiczn funkcj pełni mog produkty degradacji stanowi ce połow 3' tRNA (Li, 2009).

Istniej przesłanki wiadczy ce, e produkty degradacji tRNA funkcjonuj równie jako cz steczki sygnałne np. w procesach zależnych od stresu oksydacyjnego lub głodu. U *E. coli* wzrost poziomu nieaminoacylowanych tRNA prowadzi do akumulacji regulatora transkrypcji ppGpp, a u dro d y nieaminoacylowane tRNA wi i aktywuj kinaz białkow Gcn2p. Aktywna kinaza odpowiedzialna jest za fosforylacj jednej z podjednostek czynnika inicjacji translacji IF2. W ten sposób dochodzi do ogólnej redukcji poziomu biosyntezy białka, sprz onej ze stymulacj syntezy innego regulatora transkrypcji Gcn4p. Gcn4p z kolei wpływa pozytywnie na transkrypcj genów biosyntezy aminokwasów (Li, 2009). Je li zatem, komórka wykorzystuje tRNA jako cz steczki sygnałne, istnieje du e prawdopodobie stwo, e w tym samym celu akumuluje produkty ich degradacji. Ostatnie doniesienia sugeruj , e połowy tRNA oraz fragmenty rRNA i snRNA s obecne w ekstrakcie z wi zek przewodzcych dyni (Zhang, 2009). Spekuluje si , i powstaj one najprawdopodobniej w komórkach li ci, a nast pnie wydzielane s poprzez plazmodesmy do floemu. Długodystansowy transport produktów degradacji mo e wiadczy , i s to cz steczki sygnałne. Co wi cej, udowodniono, e zarówno ekstrakt RNA z floemu, jak i sztucznie wygenerowane fragmenty tRNA mog hamowa translacj w systemie *in vitro*. Jest to jednak uzalenie od niedenaturuj cych warunków ekstrakcji, co mo e sugerowa , e struktura drugorz dowa tych cz steczek nie jest bez znaczenia. Inn proponowan funkcj produktów degradacji tRNA transportowanych wi zkami floemu jest uczestnictwo w biosyntezie cytokinin. Wiadomo, i substratami w biosyntezie tych fitohormonów s : tRNA-Cys, tRNA-Leu, tRNA-Phe, tRNA-Trp, tRNA-Tyr i tRNA-Ser (Zhang, 2009).

tRNA, jak si okazuje, mog spełnia wiele ró nych funkcji. Tym bardziej ciekawym obiektem bada staj si ich pochodne i produkty degradacji. tRNA-Glu, bierze udział w syntezy chlorofilu u ro lin, natomiast tRNA-Gly jest zaangażowany w tworzenie si ciany komórkowej u bakterii. tRNA dekoduj cy arginin jest zaangażowany w proces potranslacyjnego dodawania reszt argininy do ko ca NH₂ białek przeznaczonych do degradacji (Nashimoto, 1993). Zachodzi on z udziałem transferazy tRNA-Arg-białko (ang.

arginyl-tRNA-protein transferase). Z kolei fragment tRNA-Lys wykorzystywany jest jako starter dla odwrotnej transkryptazy wirusa HIV (Saxena, 2002). Wszystkie wymienione tutaj typy tRNA zidentyfikowano jako źródło produktów degradacji u *A. thaliana*.

Produkty degradacji mRNA stanowi jedną z mniej licznych frakcji obu bibliotek. Powszechnie wiadomo, że prekursorzy mRNA przechodzą cały proces dojrzewania, podczas którego dochodzi do zerwania wiązania fosfodiesterowego, na przykład w trakcie splicingu, gdy z pre-mRNA wyzwalane są introny. Przez wiele lat sądzono, że introny po usunięciu z pre-mRNA ulegają degradacji do pojedynczych nukleotydów. Obecnie wiadomo jednak, że przynajmniej niektóre z nich mogą być źródłem funkcjonalnych cząsteczek takich jak miRNA czy snoRNA. Z analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wynika, że w komórce dochodzi do akumulacji fragmentów intronów. Nie jest to jednak zjawisko powszechne, ponieważ zaledwie 18% wszystkich produktów degradacji mRNA to pochodne intronów. Prawie połowa tej frakcji degradatu to fragmenty rejonów kodujących (egzonów). Możliwość powstania tych cząsteczek wydaje się być wielka. Ponieważ modulacja poziomu akumulacji transkryptów kodujących białka jest jednym ze sposobów regulacji ekspresji genów, fragmenty egzonów mogły powstać na skutek działania małych regulatorowych RNA. Ukierunkowana degradacja mRNA z udziałem np. miRNA prowadzi zwykle do przecięcia docelowej cząsteczki w jednym określonym miejscu. Jednakże w momencie, gdy dany mRNA posiada kilka swoistych miejsc oddziaływania z cząsteczkami regulatorowymi, może dojść do jego fragmentacji. Prawdopodobnie w większości sytuacji, powstałe fragmenty stanowią substraty dla enzymów egzonukleolitycznych. Niewykluczone jednak, że same mogą pełnić funkcje regulatorów. Znane są bowiem mechanizmy generowania drugorzędowych siRNA, tasiRNA, czy piRNA. Nie jest niczym zaskakującym, że sekwencja poddana ściśle z udziałem pierwotnego regulatora może być matrycą dla polimerazy RNA zależnej od RNA, za pomocą której generowany jest prekursor drugorzędowych cząsteczek regulatorowych. Wprowadzenie cząsteczek, na bazie których powstają trans-acting siRNA to transkrypty nie kodujące białek, niewykluczone jednak, że analogiczne zjawisko może dotyczyć mRNA. Oszacowano, że 30% degradatów mRNA, to matryce dla hipotetycznych białek o nieznanej dotychczas funkcji. Możliwe zatem, że najważniejszym zadaniem tych mRNA nie jest kodowanie produktu białkowego, a właśnie funkcja regulatorowa. Interesujący wydaje się również fakt, że 18% degradatu mRNA stanowi produkty rozpadu mRNA białek uczestniczących w rozprzestrzenianiu elementów mobilnych genomu (mRNA transpozazy, mRNA odwrotnej transkryptazy, mRNA białka mutT). Jak już wspomniano, piRNA i rasiRNA indukują ściśle docelowych transkryptów kodowanych przez transpozony.

Możliwe więc, że badane produkty degradacji cząstek związanych z rozprzestrzenianiem elementów mobilnych stanowi dowód na funkcjonowanie jednego z mechanizmów ograniczania transpozycji (Aravin, 2003, Brennecke, 2007; Gunawardane, 2007).

Jako, że degradacja mRNA jest jednym ze sposobów regulacji ekspresji genów, należałoby się spodziewać, że obecność produktów degradacji danego mRNA koreluje z obniżeniem ekspresji kodującego go genu. Korzystając z programu Genevestigator (Hruz, 2008) potwierdzono powyższe założenie dla 67% produktów degradacji mRNA o scharakteryzowanym profilu. Można zatem przypuszczać, że redukcja ekspresji owych genów u dojrzałych roślin, odbywa się na poziomie potranskrypcyjnym. Obecnie trudno jest bliżej scharakteryzować omawiane zjawisko, istnieje jednak duże prawdopodobieństwo, że w proces degradacji tych transkryptów zaangażowane są małe regulatorowe RNA.

Produkty degradacji mRNA to również fragmenty rejonów nie ulegających translacji z końca 5' (5' UTR) (23%) oraz cząsteczki pochodzące z rejonów połączone egzoni/intron (6%). W rejonach 5' UTR cząstek mRNA zlokalizowane są bardzo ważne elementy uczestniczące w regulacji translacji, takie jak miejsca wiązania rybosomu lub sekwencja Kozak. Obecność struktury kap oraz oddziaływanie z czynnikami inicjacji biosyntezy białka z pewnością czyni ten rejon cząstek mRNA bardziej stabilnym. Jako, że ogon poliA podlega w cytoplazmie stopniowemu skracaniu, a do momentu krytycznego, kiedy to mRNA staje się substratem dla egzozomu, być może fragmenty 5'UTR są pozostałością cząstek mRNA degradowanej w kierunku 3'-5'. Skłaniając się ku tej hipotezie, można przypuszczać, że trawienie mRNA od końca 5' rozpoczyna się odpowiednio później. Obecnie w bibliotekach cząstek o sekwencji odpowiadającej połączeniom egzoni/intron może wiadzieć np. o zachodzących procesach kontroli jakości transkryptów. Być może są to produkty degradacji cząstek, które niewłaściwie przeszły proces dojrzewania, wskutek czego zostały skierowane na drogę rozkładu. Nie jest również wykluczone, że fragmenty te powstały z funkcjonalnych cząstek poddanych alternatywnemu splicingowi. Ponieważ miejsca łączące egzony i introny są istotne z punktu widzenia poprawności procesów składania, być może analizowana frakcja degradatu odgrywa swoistą rolę w dojrzewaniu mRNA.

Obok produktów degradacji rRNA, tRNA i mRNA, w puli cDNA obu bibliotek występowały również cząsteczki zaklasyfikowane jako małe niekodujące RNA, będące fragmentami ich prekursorów. Istniała także dołączona frakcja cząstek, które odpowiadały niescharakteryzowanemu, jak dotychczas, transkryptom pochodzącym z rejonów międzygenowych. Zdecydowana większość frakcji zaklasyfikowanej jako niekodujące RNA i cząsteczki

związane z biogenezą małych niekodujących RNA to RNA o niepoznanej funkcji (59%). Liczną grupę stanowi również miRNA i tasiRNA (31%). Wiąkszość z tych cząstek nie można jednak zaliczyć do degradatu RNA. Stanowi one bowiem dojrzałe i funkcjonalne cząsteczki, powstałe z zakodowanych w genomie prekursorów. Część z nich nie odpowiada jednak kanonicznej cząsteczce miRNA lub odpowiada cząsteczce skróconej o kilka nukleotydów. Dwie cząsteczki należące do frakcji miRNA wydają się być szczególnie interesujące z uwagi na swoją lokalizację w obrębie cząsteczki prekursora. Jedną z nich, zaklasyfikowaną jako MIR161, to hybryda fragmentu prekursora i dojrzałego miRNA, druga stanowi ni anty-miRNA (MIR399). Funkcja miRNA i tasiRNA zidentyfikowanych w obrębie biblioteki RNA18-73 jest znana, a cząsteczki docelowe, znajdujące się pod ich kontrolą są dobrze scharakteryzowane. Nie stwierdzono jednak, aby opisane wcześniej produkty degradacji mRNA pochodziły z ich transkryptów docelowych. Pozostałe, cząsteczki o niezdefiniowanej roli, stanowią pulę potencjalnych regulatorów ekspresji. Ocena ich wpływu na ekspresję genów wymaga jednak dogłębnych analiz funkcjonalnych.

10% populacji omawianej w tym miejscu frakcji RNA stanowi produkty degradacji małych jądrowych RNA (U2 i U4.2 snRNA). snRNA pełni bardzo ważną funkcję w procesie wycinania intronów z prekursorów mRNA, a są biologicznie aktywno wykazują w kompleksach z białkami. Przyjmuje się, że są to do stabilne cząsteczki o zachowawczej sekwencji. Za ich stabilność odpowiedzialne są m. in. liczne modyfikacje, chociażby strukturalne czapki na końcu 5'. snRNA U2 wraz z snRNA U6 tworzą centrum katalityczne spliceosomu, natomiast snRNA U4 odgrywa rolę inhibitora, który blokuje U6 do czasu, kiedy miejsca splicingowe pre-mRNA zostaną prawidłowo zorientowane względem siebie (Berg, Stryer, Tymoczko, Biochemia wyd. III). Byłoby ciekawe analizowane tutaj produkty degradacji cząstek snRNA świadczą o niepoznanym dotychczas mechanizmie regulacji splicingu. Jak już wcześniej wspomniano, fragmenty snRNA wraz z produktami degradacji tRNA i rRNA transportowane są w wiązках przewodzących floemu. Postuluje się, że mogą one pełnić funkcję cząstek sygnałowych, niosących informacje do odległych części rośliny o stanie metabolicznym organów (prawdopodobnie liści), w których są syntetyzowane a następnie degradowane.

Bardzo intrygująca i ciekawa wydaje się być frakcja cząstek, które odpowiadają niescharakteryzowanym dotychczas transkryptom pochodzącym z rejonów międzygenowych. Nic nie wiadomo o sposobie powstawania tych cząstek. Nie wiadomo też, czy zgodnie z przyjętą na wstępie definicją można je uznać za degradat RNA. Jeżeli przyjęte jest, że są to produkty degradacji większych jednostek transkrypcyjnych, wówczas należałoby ustalić, jak

funkcj pełni ich prekursorzy? Kilka z analizowanych cz steczek zdefiniowano jako transkrypty nici antysens. Trudno jednak stwierdzić, czy ich pochodzenie ma związek z biogenez tzw. nat-siRNA.

Degradom RNA stanowi bardzo zróżnicowaną populację cz steczek. Po analizie składu nukleotydowego wszystkich frakcji degradomu, stwierdzono, że procentowa zawartość reszt GC jest najwyższa w przypadku produktów degradacji rRNA i tRNA (odpowiednio 56% i 57%). Produkty degradacji mRNA i cz steczki związane z biogenez małych niekodujących RNA wykazują zbliżoną zawartość reszt GC (odpowiednio 49% i 50%). Najmniej reszt GC charakteryzuje natomiast cz steczki pochodzące z niepoznanych dotychczas transkryptów rejonów mi dzigenowych (46%). Sekwencje tych ostatnich, oraz cz steczek związanych z biogenez małych niekodujących RNA, bogate są w zasady purynowe. W produktach degradacji mRNA dominują natomiast zasady pirymidynowe, a produkty degradacji rRNA i tRNA cechuje zbliżona zawartość zasad purynowych i pirymidynowych. Widać zatem, że poszczególne frakcje degradomu posiadają nieco domienny skład nukleotydowy. Dodatkowo również w obrębie każdej frakcji obserwowano dużą zmienność zawartości poszczególnych reszt nukleotydowych.

Uzyskane wyniki tylko częściowo pokrywają się z wiedzą na temat procentowej zawartości reszt GC w sekwencji cz steczek pełnej długości, należących do danej klasy RNA. Inaczej niż w przypadku produktów degradacji, średnia zawartość procentowa GC dla cz steczek tRNA wynosi 48. Cz steczki rRNA wykazują wartość zbliżoną (55% GC), do obserwowanej w przypadku ich degradantów. Podobnie mRNA (50% GC) i powstałe z nich fragmenty. (Long i Mishra, 2006). Ze względu na to, że frakcja degradantów związanych z biogenez małych niekodujących RNA zawiera cz steczki o różnym pochodzeniu, nie można porównać ich składu z danymi grup modelowymi. Wiadomo jednak, że prekursorzy rolinnych miRNA charakteryzuje stosunkowo niska zawartość reszt GC, 46%. Odpowiada to zatem sytuacji obserwowanej w przypadku zidentyfikowanych cz steczek pochodzenia mi dzigenowego.

Analiza strukturalna degradomu RNA wykazała, że 72% wszystkich cz steczek, dla których współczynnik MFE(S) wynosił $-0,3$ i mniej to produkty degradacji tRNA. Jak już wspomniano, struktura przestrzenna produktów rozpadu rRNA czy tRNA może mieć duże znaczenie podczas regulacji ekspresji genów z udziałem tRNazy Z. Oddziaływania pomiędzy połową tRNA lub fragmentem rRNA a cz steczką docelowo zmierzają do odtworzenia i naładowania struktury drugorzędowej naturalnych substratów tRNazy Z. Ta swoista mimikra molekularna jest warunkiem, który musi zostać spełniony, aby enzym ten precyzyjnie przeci-

cz steczk RNA. Wszystkie analizowane frakcje degradomu charakteryzują się bardzo różnorodną stabilnością termodynamiczną. Wynika z tego, iż w komórce dochodzi do akumulacji zarówno strukturalnie stabilnych molekuł, jak i tych, które prawdopodobnie nie tworzą stabilnych struktur przestrzennych. Trudno stwierdzić, czy taka różnorodność ma związek ze sposobem degradacji i jak wpływa na trwałość uwalnianych cz. steczek. Szczególnie interesujące wydają się jednak przypuszczenia, że struktura przestrzenna może determinować funkcje analizowanej grupy degradantów.

VI.5. Produkty degradacji jako potencjalne cz. steczki regulatorowe

Obecnie znanych jest wiele małych regulatorowych RNA, które służą jako specyficzne sondy kierujące multienzymatyczne kompleksy białkowe do cz. steczek DNA i RNA. Pełna lub prawie pełna komplementarność w miejscu oddziaływania małego RNA z cz. steczką docelową wymusza jej przecięcie. Znane są również przypadki rolinnych regulatorowych RNA, które wykazują ograniczoną komplementarność w stosunku do cz. steczek docelowych i uczestniczą w blokowaniu translacji. Cz. regulatorowych RNA występujących u organizmów eukariotycznych posiada własne geny. Ich prekursorzy powstają jako niezależne jednostki transkrypcyjne. Inne, natomiast, powstają w komórkach jako wtórne produkty obróbki długich dupleksów RNA. Nie można zatem wykluczyć, że cz. steczki RNA, które w procesie degradacji rozpadają się według zachowawczych wzorów mogą również stanowić źródło regulatorowych RNA.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że nieco ponad 1/3 degradomu RNA wykazuje całkowitą lub częściową komplementarność do cz. steczek mRNA lub pre-mRNA. Najczęściej region komplementarny występuje w obrębie egzonów mRNA (46%), nieco rzadziej dotyczy to intronów, obszaru UTR, połacie egzon/intron lub egzon/UTR. Długo dopasowania wynosi najczęściej 16-14 nt (58% analizowanych cz. steczek). Dopasowanie w tych przypadkach zwykle nie obejmuje całej sekwencji produktu degradacji. Wiadomo jednak, że dla duplesu, jaki tworzy się pomiędzy miRNA i cz. steczką docelową najistotniejszy jest tzw. region rdzeniowy (ang. *seed region*). Jest to odcinek złożony z nukleotydów zajmujących pozycje 2-8 licząc od końca 5' cz. steczki regulatora (Doench i Sharp, 2004). Komplementarność ograniczona do kilkunastu nukleotydów jest zatem w pełni wystarczająca aby mogło dojść do regulacji ekspresji określonego genu. Dla pozostałych analizowanych cz. steczek komplementarne dopasowania obejmowały odcinek o długości 19-17 nt (16%) a także 20 i więcej nukleotydów (26%). Jak już wspomniano, pełna

komplementarno na odcinku ~20 par zasad w miejscu oddziaływania małego RNA z czeczk docelow jest zjawiskiem cz sto spotykanym u ro lin.

Stwierdzenie komplementarno ci pomi dzy mRNA kodowanymi przez *A. thaliana* a analizowanymi produktami degradacji pozwala zakwalifikowa te ostatnie do grupy potencjalnych cz steczek regulatorowych. Wykorzystanie przez maszyneri RNAi produktów degradacji funkcjonalnych jednostek transkrypcyjnych, wydaje si bardzo prawdopodobne. Synteza i dojrzewanie małych regulatorowych RNA, jak miRNA wymaga bowiem sporych nakładów energii. U ycie powszechnie dost pnych produktów degradacji jako regulatorów oznaczałoby zatem zmniejszenie kosztów utrzymania homeostazy komórkowej.

List mRNA/pre-mRNA wykazuj cych komplementarno wobec cz steczek RNA obu bibliotek zamieszczono w Tabeli nr V.6. W ród nich znajduj si m. in. matryce do syntezy białek cytochromu, białek błonowych, takich jak ATPazy, homolog epsyny, białko błonowe tylakoidów, transportery a tak e kinazy i fosfatazy. Wiadomo, i regulatorowe RNA cz sto kontroluj ekspresj innych genów poprzez obni anie poziomu akumulacji czynników transkrypcyjnych. Równie w przypadku prezentowanych tutaj analiz, zidentyfikowano kilka mRNA dla czynników transkrypcyjnych. Szczególn uwag zwraca komplementarne dopasowanie produktów degradacji RNA do mRNA szeregu białek zwi zanych z rozprzestrzenianiem si w genomie elementów mobilnych oraz pseudogenów. Inne wa niejsze to: mRNA hydrolaz, oksydaz, transferaz, białek zaangażowanych w podziały mitotyczne (białko pokrewne kinezyinie, białko z rodziny kohezyn) oraz wi zanie kwasów nukleinowych (białka PPR, białka RRM). Na uwag zasługuj tak e mRNA transportera auksyn oraz inhibitora kinazy zależnego od cykliny, mRNA białka z rodziny ENOD, czy mRNA białka E2 kompleksu splicingowego (snRNP-E).

Badania *in silico* sugeruj zatem, e przynajmniej cz degradomu RNA mo e by ródłem cz steczek regulatorowych. Potwierdzenie niniejszych przypuszcze wymaga jednak przeprowadzenia gł bszej analizy funkcjonalnej.

VI.6. Produkty degradacji RNA jako biomarkery zmian zachodz cych w komórce pod wpływem endo- i egzogennych czynników

Aby sprawdzi czy czynniki endo- i egzogenne wywieraj wpływ na profil degradomu RNA, poddano analizie preparaty RNA<120 izolowane z *A. thaliana* posiadaj cych nieaktywny jeden z genów *dcl* oraz ro lin wzrastaj cych w warunkach silnego zasolenia. Genom *A. thaliana* koduje cztery białka DCL. Rybonukleaza DCL1 uczestniczy w biogenezie miRNA, z kolei rybonukleaza DCL2 odpowiada za produkcj ta-siRNA oraz siRNA

indukowanych infekcji wirusów. DCL3 bierze udział w biogenezie 24-nt siRNA pochodzących z sekwencji transpozonów oraz retroelementów i odpowiedzialnych za metylację chromatyny. Od ostatniego z białek, DCL4, zależy natomiast produkcja pierwszorzędowych 21 nt siRNA pochodzących z endo- lub egzogennych sekwencji powtórzonych oraz drugorzędowych siRNA (ta-siRNA) zaangażowanych w przekazywanie sygnału wyciszania. Mutacja w którymkolwiek z genów *dcl* powoduje zatem deficyt pewnej grupy małych regulatorowych RNA. Zdarza się jednak, iż dezaktywacja jednego z białek, sprawia, iż jego funkcje przejmie inna rybonukleaza DCL. Wiadomo na przykład, że wobec dysfunkcji rybonukleazy DCL4, za syntezę siRNA pochodzenia wirusowego odpowiada białko DCL2.

Analiza porównawcza autoradiogramów uzyskanych w wyniku rozdziału metod 2D-E preparatów RNA<120 izolowanych z liści mutantów (*dcl1-4*) pokazała, że aktywność enzymów zaangażowanych w biogenezę małych regulatorowych RNA wywiera bardzo ograniczony wpływ na degradację RNA. Profile akumulacji degradantów tylko subtelnie różniły się od charakterystycznego wzorca uzyskanego dla rośliny dzikiej, co sugeruje, iż w większości przypadków analizowany proces degradacji, jest niezależny od zjawiska RNAi. Najwięcej zmian zanotowano w przypadku degradacji rośliny *dcl1-7* i *dcl3-2*. Pierwszy z nich uległ zmianie prawdopodobnie na skutek zahamowania ukierunkowanej degradacji mRNA zachodzącej przy udziale miRNA. Natomiast mutacja w genie *dcl3* wpłynęła negatywnie na produkcję siRNA pochodzących z sekwencji transpozonów oraz retroelementów. Z prezentowanych wcześniej wniosków, wynika, iż degradacji to fragmenty mRNA białek uczestniczących w rozprzestrzanianiu elementów mobilnych genomu. Pewne produkty degradacji RNA wykazują również komplementarność wobec sekwencji transpozonów. Stąd te zauważalne zmiany w profilu degradacji mutantów *dcl3-2* mogą być częściowo konsekwencją zaburzonej kontroli transpozycji. Degradacja RNA mutantów *dcl2-1* i *4-1* wydaje się być zbliżona do wzorca charakteryzującego rośliny dzikie. Może to wynikać z wcześniej wspomnianej komplementacji funkcji białek DCL2 i DCL4.

Zmiany w degradacji RNA *A. thaliana* indukował również stres osmotyczny spowodowany zaburzeniem równowagi jonowej na skutek wysokiego zasolenia. Wpływa on na bilans wodny komórek i prowadzi do obniżenia ich turgoru. Dodatkowo niekontrolowany napływ jonów sodu do komórek i ich akumulacja w cytoplazmie mogą mieć negatywny wpływ na aktywność enzymów komórkowych. Odpowiedź rośliny na stres osmotyczny wyraża się więc poprzez zmianę ekspresji genów, która ma na celu odbudowę homeostazy komórkowej. W regulacji wielu procesów związanych ze stresem lub od niego zależnych

szczególną rolę odgrywają małe regulatorowe RNA. W takiej sytuacji, zmiany w degradacji RNA rośliny poddanej stresowi osmotycznemu, wydają się logiczną konsekwencją wszystkich fizjologicznych i patologicznych procesów, które w niej zachodzą. Trudno powiedzieć, czy degradacja RNA sama w sobie może być odpowiedzią na wysokie zasolenie. Hipoteza ta wydaje się być prawdopodobna zwłaszcza wtedy, gdy niektóre produkty degradacji RNA mogłyby funkcjonować jako potencjalne regulatory lub czynniki sygnałowe.

Wydaje się zatem, że unikalne zmiany zachodzące w degradacji RNA pod wpływem różnych czynników endo- i egzogennych pozwolą w przyszłości wykorzystać ją jako źródło specyficznych biomarkerów. Istotne znaczenie dla dalszych badań będzie miała pełniejsza identyfikacja i opis poszczególnych elementów degradacji. Wymaga to jednak dopracowania metod analizy indywidualnych produktów degradacji. Jedynie bardzo dobrze udokumentowane różnice mogą być przydatne przy próbie zastosowania produktów degradacji jako biomarkerów opisujących stan fizjologiczny komórki.

VI.7. Zmiany w degradacji RNA uwarunkowane rozwojem brodawki korzeniowej *Lupinus luteus*

Wyniki eksperymentów prowadzonych w ramach niniejszej pracy sugerowały, że degradacja RNA *A. thaliana* jest organo-specyficzna oraz podlega wpływowi czynników endo- i egzogennych. Zaproponowano również, że degradacja różnych typów RNA nie jest procesem przypadkowym. Prawdopodobnie zachodzi ona w sposób powtarzalny i ukierunkowany na powstawanie specyficznych produktów. W oparciu o zdobyte doświadczenia, postanowiono stwierdzić, czy można pomyśleć o analizie degradacji RNA w celu opisu zmian fizjologicznych zachodzących podczas jakiegoś dobrze poznanego procesu. Spodziewając się, że do szczególnie istotnych zmian dochodzi również podczas procesów rozwojowych, postanowiono wykorzystać modelowy układ stosowany w badaniach organogenezy u roślin. Układem tym były brodawki korzeniowe rozwijające się podczas symbiozy roślin motylkowatych z bakteriami wiążącymi azot.

Azot cząsteczkowy (N_2) występuje obficie w glebie i atmosferze, jednak w odróżnieniu od tlenu cząsteczkowego nie może być bezpośrednio wykorzystywany przez rośliny i zwierzęta. Do asymilacji N_2 zdolne są niektóre wolnożyjące sinice, bakterie i archebakterie. Złożone systemy wiązania azotu cząsteczkowego funkcjonują natomiast w układach symbiotycznych tworzonych przez mikroorganizmy oraz niektóre gatunki roślin. Szczególnie dobrze poznana została symbioza roślin motylkowych (*Fabaceae*) z rizobiami

(*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Azorhizobium*). Jest ona od lat badana między innymi na przykładzie łubinu oraz bakterii *Bradyrhizobium lupini*.

W wyniku oddziaływań pomiędzy roślinami motylkowatymi a bakteriami powstaje nowy organ, brodawka korzeniowa. Regulacja organogenezy brodawki jest przedmiotem szczególnego zainteresowania badaczy. W przeciwieństwie do ostatnich dwóch dekad zidentyfikowano szereg genów, które ulegają ekspresji na różnych etapach rozwoju brodawki. Aktywność tzw. wczesnych genów nodulacji, do których zaliczyć można na m.in. *enod2*, *enod5*, *enod12*, *enod40*, skorelowana jest z procesami zachodzącymi podczas preinfekcji oraz morfogenezy brodawki. Geny te ulegają ekspresji w godzinę lub kilka dni po inokulacji rizobiami. Natomiast ekspresja tzw. późnych genów nodulacji (np. leghemoglobiny, syntazy glutaminianowej) charakteryzuje brodawki dojrzałe, w których zachodzi wiązanie N₂ i asymilacja amoniaku (Szczygłowski, 1997). Od pewnego czasu wiadomo również, że w regulacji symbiozy biorą udział małe niekodujące RNA. Przykładem może być miR169 kontrolujący poziom mRNA kluczowego czynnika transkrypcyjnego MtHAP2-1 zaangażowanego w rozwój brodawki korzeniowej u *Medicago truncatula* (Comber, 2006). Jeśli przyjmiemy, że produkty degradacji różnych transkryptów mogą funkcjonować jako potencjalne regulatory lub czynniki sygnałowe, można oczekiwać, że ich rola w procesie nodulacji nie jest bez znaczenia.

Analizy preparatów RNA<120 pochodzących z nieinfekowanych korzeni oraz brodawek korzeniowych na różnym etapie rozwoju okazały się bardzo obiecujące. Samo tylko porównanie autoradiogramów wykazało zaskakujące podobieństwo degradomu RNA z tkanki korzenia do tego, pochodzącego z 24-dniowych, w pełni dojrzałych brodawek. Natomiast degradomy izolowane z brodawek zebranych 8 dni po infekcji oraz brodawek starszych niż 76 dni (76 dpi), znacznie odbiegały od pozostałych. Można zatem stwierdzić, że wraz z osiągnięciem przez komórki kolejnych etapów rozwojowych w sposób powtarzalny zmienia się skład degradomu RNA.

Co ciekawe, obserwowane zmiany degradomu RNA wydają się mieć związek z ogólnym schematem rozwoju brodawek i szczególnie dobrze koreluje ze zmianami profilu ekspresji ferrytyny. Ferrytyna jest białkiem, które magazynuje żelazo w sposób kontrolowany uwalniając go. Wiadomo, że w początkowych etapach rozwoju brodawki, gdy rozpoczyna się synteza białek wchodzących w skład aparatu asymilacyjnego, w tym leghemoglobiny, wyraźnie wzrasta również akumulacja ferrytyny. Jest to wynikiem stresu oksydacyjnego wywołanego syntezą hemu i zapoczątkowaniem procesu redukcji azotu atmosferycznego w komórkach rozwijającego się organu. W tym początkowym okresie infekcji degradom RNA ulega istotnym zmianom. W dojrzałej brodawce żelazo zaangażowane jest w tworzenie

funkcjonalnych elementów aparatu symbiotycznego (leghemoglobina, nitrogenaza). Taka sytuacja prowadzi do spadku poziomu stresu oksydacyjnego, przez co obniżyć ulega również poziom syntezy ferrytyny. „Powrót” degradacji RNA do stanu wyjściowego, sprzed infekcji, może być właśnie odzwierciedleniem stanu stabilizacji procesów molekularnych zachodzących w dojrzałej brodawce. Potwierdza to hipotezę, iż w stabilnych warunkach, pewne mechanizmy kierujące degradacją cząstek RNA są powszechne i uniwersalne dla wszystkich komórek danego organizmu. Prowadzi to w konsekwencji do akumulacji podstawowej populacji produktów degradacji RNA. W brodawce starszej obserwuje się natomiast miejsce wstrzymania procesów redukcji azotu oraz rozkład enzymów biorących w niej udział. Stąd te jony żelaza, uwolnione m.in. z leghemoglobiny i nitrogenazy prowadzą do wzrostu zagrożenia oksydacyjnego, a jedną z reakcji obronnych jest wzrost poziomu syntezy ferrytyny. W rezultacie dochodzi też do wyraźnych zmian w degradacji RNA.

Jak już wcześniej wspomniano sytuacje stresowe prowadzą do ukierunkowanej degradacji RNA. Produkty degradacji cząstek RNA są następnie akumulowane w komórkach lub transportowane w rolniczym przewodzie floemu. Silny stres oksydacyjny towarzyszy dojrzewaniu i starzeniu się brodawki korzeniowej może zatem indukować drastyczne zmiany metabolizmu RNA. Stąd też charakterystyczny profil degradacji RNA organów młodych i starszych jest najprawdopodobniej odpowiedzią na masowe pojawienie się w komórce wolnych rodników. Niestety ze względu na brak znajomości pełnej sekwencji genomu łubinowego nie sposób jednoznacznie określić, jakie jest pochodzenie poszczególnych cząstek. Niemniej jednak, już sama tylko wstępna analiza uzyskanych autoradiogramów wykazuje, że uzasadnione jest zarówno poszukiwanie regulatorów nodulacji wśród cząstek degradacji, jak również wykorzystanie jego elementów jako biomarkerów procesów rozwojowych.

VII. PODSUMOWANIE

Zaprezentowane powyżej wyniki pozwalają s dzi , i podczas procesu degradacji funkcjonalnych cz steczek RNA powstaj stabilne produkty przej ciowe. Zdecydowana wi kszo wyizolowanych cz steczek RNA o długo ci od ~18 do 70 nukleotydów została zaklasyfikowana jako degradanty. Na podstawie ich analizy mo na przypuszcza , e ka demu stanowi fizjologicznemu komórki odpowiada charakterystyczny degradom RNA.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów opracowano metodyk analizy degradomu RNA, przy u yciu dwukierunkowej elektroforezy RNA w elach PAA. Stwierdzono, e ze wzgl du na swój specyficzny charakter degradom RNA mo e stanowi element opisu aktywno ci wybranej grupy komórek lub tkanek.

Na bazie degradomu RNA skonstruowano dwie biblioteki cDNA. Do uzyskania pierwszej zwanej bibliotek RNA18-73 u yto jako matryc wszystkie wyizolowane cz steczki o długo ci od 18 do 73 nt. W celu stworzenia drugiej biblioteki, zwanej RNA70 przeprowadzono dwukierunkow elektroforez a nast pnie wyci to z elu 70 indywidualnych plamek wykazuj cych najwy sz intensywno , wyizolowane z nich RNA posłu yły do otrzymania cDNA. Analiza bioinformatyczna 194 uzyskanych sekwencji wykazała, e wi kszo to produkty degradacji tRNA, rRNA lub mRNA. Cz pochodzi jednak z rozpadu transkryptów o niepoznanej dot d funkcji.

Na podstawie analizy bioinformatycznej stwierdzono, e produkty degradacji mog stanowi ródło cz steczek regulatorowych. Ustalono, i 35% zidentyfikowanych degradantów wykazuje co najmniej cz ciow komplementarno do mRNA/pre-mRNA syntetyzowanych w komórkach *A. thaliana*.

Oceniono tak e, jak na skład degradomu RNA wpływaj ró ne czynniki endo- i egzogenne. W tym celu przeprowadzono analiz degradomów RNA izolowanych z li ci mutantów *A. thaliana* (4 mutanty, ka dy z nieaktywnym jednym genem *dcl*) oraz ro lin poddanych stresowi osmotycznemu. Dodatkowo zbadano zmiany zachodz ce w degradomie RNA podczas rozwoju brodawek symbiotycznych na korzeniach łubinu ółtego. W rezultacie wykazano, i zastosowane techniki mog słu y identyfikacji biomarkerów, b d cych produktami degradacji RNA.

VIII. STOSOWANE SKRÓTY

APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno trójfosforan
BB	bł kit bromofenolowy
DEPC	dietylopirow glan
DTT	ditiotreitrol
EDTA	kwias etylenodiaminoczterooctowy
ER	enzym restrykcyjny
EtOH	etanol
IPTG	isopropylotio- -D-galactozyd
MES	kwias 2-[morfolino]etanolosulfonowy
nt	nukleotydy
NaCl	chlerek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
PAA	poliakrylamid
PAP	polimeraza poli(A)
PAGE	elektroforeza w elu poliakrylamidowym,
pol	polimeraza
pz	par zasad
RT	odwrotna transkryptaza
SDS	dodecylosiarczan sodu
SSC	bufor cytrynianu sodu, ang. <i>saline-sodium citrate</i>
T4 PNK	kinaza polinukleotydowa T4
TEMED	N, N, N', N' – tetrametylenoetylenodiamina
Tm	temperatura topnienia
UTR	region nie podlegaj cy translacji
XC	ksylen cyjanu
X-Gal	bromo-chloro-indolyl-galactopiranozyd
2D-E	dwukierunkowa elektroforeza

Trzyliterowe symbole aminokwasów stosowane do opisu dekodujących je tRNA

Ala – alanina

Arg – arginina

Asn – asparagina

Asp – kwas asparaginowy

Cys – cysteina

Gln – glutamina

Glu – kwas glutaminowy

Gly – glicyna

His – histydyna

Ile – izoleucyna

Leu – leucyna

Liz – lizyna

Met – metionina

Phe – fenyloalanina

Pro – prolina

Ser – seryna

Thr – treonina

Trp – tryptofan

Tyr – tyrozyna

Val - walina

IX. LITERATURA

1. Adenot X. i in. (2006). DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr. Biol.* Vol. 16, 927–932
2. Allen E. i in. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* Vol. 121, 207–221
3. Allen T.A. i in. (2004). The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 11, 816–821
4. Amaral P.P. i in. (2008). The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* Vol. 319, 1787–1789
5. Ansel K.M. i in. (2008). Mouse Eri1 interacts with the ribosome and catalyzes 5.8S rRNA processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 15, 523–530
6. Aravin A.A. i in. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* Vol. 5, 337–350
7. Aravin A.A. i in. (2006). A novel class of small RNAs binds to MILI protein in mouse testes. *Nature* Vol. 442, 203–207
8. Baranowska-Morek A., 2003. Ro linne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich. *Kosmos* Vol. 52, 283–298
9. Bari R. i in. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* Vol. 141, 988–999
10. Barreau C. i in. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* Vol. 33, 7138–7150
11. Bartel D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* Vol. 116, 281–297
12. Bartolomei M.S. i in. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* Vol. 351, 153–155
13. B kowska K. (2005). Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka. *Biotechnologia* Vol.69, 206–214
14. Beggs J.D. (2005). Lsm proteins and RNA processing. *Biochem. Soc. Trans.* Vol. 33, 433–438
15. Berstein J. Patterson D.N. Wilson G.M. Toth E.A. (2008). Characterization of the Essential Activities of *Saccharomyces cerevisiae* Mtr4p, a 3_35_ Helicase Partner of the Nuclear Exosome. *Jurnal Biol. Chem.* Vol. 283, 799–816
16. Borek E. i in. (1977). High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. *Cancer Res.* Vol. 37, 3362–3366
17. Borsani O. i in. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* Vol. 123, 1279–1291

18. Brennecke J. i in. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* Vol. 128, 1089-1103
19. Brown (2009). *Genomy*
20. Buhler M. i in. (2008). TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNA into the *Schizosaccharomyces pombe* siRNA pathway. *Nat. Struc. Mol. Biol.* Vol. 15, 1015-1023
21. Burleigh S.H. i Harrison M.J. (1999) The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol.* Vol. 119, 241–248
22. Cai X. i Cullen B.R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* Vol. 13, 313–316
23. Campalans A. i in. (2004). Enod40, a short open reading frame containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* Vol. 16, 1047–1059
24. Carroll K.L. i in. (2007). Interaction of yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nrd3 with RNA polymerase II terminator elements. *RNA* Vol.13, 361-373
25. Carthew R.W. I Sontheimer J.E (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* Vol. 136, 642–655
26. Chandran V. i in. (2007). Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhIB and ribonuclease RNase E. *J. Biol. Mol.* Vol. 367, 113-132
27. Chapman E.J. i Carrington J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature* Vol. 8, 884-896
28. Chapman K.B. i Boeke J.D. (1991). Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell* Vol. 65, 113-132
29. Chaumeil J. i in. (2006). A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev.* Vol. 20, 2223–2237
30. Chernyakov I. i in. (2008). Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. *Genes Dev.* Vol. 22, 1369-1380
31. Cho J. i in. (2005). Isolation and characterization of cDNA clones expressed under male sex expression conditions in a monoecious cucumber plant (*Cucumis sativus* L. cv. winter long). *Euphytica* Vol. 146, 271–281
32. Colgan D.F. I Manley J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* Vol. 11, 2755-2766
33. Combier J.P. i in. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev.* Vol. 20, 3084–3088

34. Copela L.A. i in. (2008). Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation. *RNA* Vol. 14, 1214-1227
35. Cordin O. i in. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37
36. Cougot N. i in. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell. Biol.* Vol. 165, 31-40
37. Crespi M.D. i in. (1994). enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* Vol. 13, 5099–5112
38. Dai X. i in. (2007). Overexpression of Zm401, an mRNA-like RNA, has distinct effects on pollen development in maize. *Plant Growth Regul.* Vol. 52, 229–239
39. Dai X-Y. i in. (2004). Non-coding RNA for Zm401, a pollen-specific gene of *Zea mays*. *Acta Bot. Sin.* Vol. 46, 497–504
40. Deshmukh M.V. i in. (2008). mRNA decapping is promoted by an RNA-binding channel in Dcp2. *Mol. Cell* Vol. 29, 324-336
41. Deutscher Murray P. (2003) Degradation of Stable RNA in Bacteria. *Jurnal Biol. Chem.* 2003, Vol. 278, No.46
42. Deutscher Murray P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *NAR*, Vol. 34. No.2
43. Doench J.G. i Sharp P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* Vol. 18, 504–511
44. Doma M.K. i Parker R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. *Cell* Vol. 131, 660-668
45. Dong J. Qiu H. Garcia-Barrio M. i in. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* Vol. 6, 269-279
46. Elbarbary R.A. i in. (2009). Modulation of Gene Expression by Human Cytosolic tRNase Z^L through 5'-Half-tRNA *PLOS* Vol. 4, e5908
47. Eulalio A, Behm-Ansmant I. and Izaurralde E.(2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 8, 9-22
48. Eystathioy T. i in. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW128, associates with a unique population of human mRNA within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell* Vol. 13, 1338-1351
49. Fang Y. i Spector D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr. Biol.* Vol. 17, 818-823
50. Fasken M. B. i Corbett A.H. (2005). Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nature Struct. Mol. Biol.* Vol. 12, 482–488
51. Fenger-Gron M. i in. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell* Vol. 20, 905-915
52. Franco-Zorrilla J.M. i in. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* Vol. 39,1033–1037

53. Franks T.M. i Lykke-Andersen J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* Vol.32, 605-615
54. Frischmeyer, P. A. in. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* Vol. 295, 2258–2261
55. Gabel H.W. i Ruvkun G. (2008). ERI-1 has a conserved dual role in 5.8S rRNA processing and RNAi. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 15, 531-533
56. Girard G. i in. (2003). Structural motifs in the RNA encoded by the early nodulation gene *enod40* of soybean. *Nucleic Acids Res.* Vol. 31, 5003–5015
57. Gribnau J. i in. (2000). Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus. *Mol. Cell* Vol. 5, 377–386
58. Gruber A.R. i in. (2008). Invertebrate 7SK snRNAs. *J. Mol. Evol.* Vol. 66, 107–115
59. Gudipati R.K. i in. (2008). Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain dictates transcription termination choice. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 15, 786-794
60. Gunawardane L.S. i in. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* Vol. 315, 1587-1590
61. Haiser H.J. i in. (2008). Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* Vol. 36, 732–741
62. Hao S. Sharp J. W. Ross-Inta C. M. i in. (2005). Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* Vol. 307, 1776-1778
63. Henras A. i in. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* Vol.65, 2334-2359
64. Henz S.R. i in. (2007). Distinct expression patterns of natural antisense transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 144, 1247–1255
65. Hirota K. i in. (2008). Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* Vol. 456, 130–134
66. Hirsch J. i in. (2006). Characterization of 43 non-protein-coding mRNA genes in *Arabidopsis*, including the MIR162a-derived transcripts. *Plant Physiol.* Vol. 140, 1192–1204
67. Hollick J.B. (2008). Sensing the epigenom. *Trends in Plant Science.* Vol. 13, 398-404
68. Hong Y. i in. (1998). Novel structures of two virus-like RNA elements from a diseased isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. *Virology* Vol.242, 80-89
69. Houseley J. i Tollervey D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation, *Cell* Vol. 136, 763-776
70. Houseley, J. LaCava, J. i Tollervey D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 7, 529–539.
71. Jen C.H. i in. (2005). Natural antisense transcripts with coding capacity in *Arabidopsis* may have a regulatory role that is not linked to double-stranded RNA degradation. *Genome Biol.* Vol. 6, R51

72. Jinek M. i Doua A. (2009). A tree-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* Vol. 457, 405-412
73. Jing Q. i in. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* Vol. 120, 623-634
74. Jochl C. i in. (2008). Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* Vol. 36, 2677–2689
75. Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. i Bartel B. (2006). MicroRNA and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 57, 19-53
76. Kadaba S.i in. (2006). Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA* Vol. 12, 508-521
77. Kasschau K.D. i in. (2007). Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol.* Vol. 5, e57
78. Kastenmayer J. P. i Green P. J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2pyRat1p, functions in the cytoplasm. *PNAS* Vol. 97(25), 13985–13990
79. Katiyar-Agarwal S. i in. (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes&Dev.* Vol. 21, 3123-3134
80. Kim V. i Nam J. (2006). Genomics of microRNA. *TRENDS in Genet.* Vol. 22, 165-173
81. LaRiviere F.J. i in. (2006). A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol Cell* Vol. 24, 619-626
82. Lebreton A. i in. (2008) Endonucleolytic cleavage by eukaryotic exosome. *Nature* Vol. 456, 993-996
83. Lee S. R. i Collins K. (2005). Starvation-induced cleavage of tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *J. of Biol. Chem.*
84. Lee Y. i in. (2003). The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* Vol. 425, 415-419
85. Li L. i in. (2007). Global identification and characterization of transcriptionally active regions in the rice genome. *PLoS ONE* 2, e294
86. Li Y. I Zhou H. (2009). tRNAs as regulators in gene expression. *Sci China Ser C-Life Sci* Vol.52, 245-252
87. Li Y. i in. (2008). Stress-Induced tRNA-derived RNAs: a novel class of small RNAs in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Nucl. Acids Res.* Vol. 36, 6048-6055
88. Loong N.NG.K. I Mishra S.K. Unique folding of precursor microRNAs: Quantitative evidence and implications for de novo identification. *RNA* Vol. 13, 170-187
89. Lorentzen E. i Conti E. (2006). The exosome and the proteasome: nanocompartments for degradation. *Cell* Vol. 125, 651-654

90. Lu C. i in. (2005). Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* Vol. 309, 1567–1569
91. Luke B i in. (2008). The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* Vol. 32, 465-477
92. Lund E. i in. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* Vol. 303, 95-98
93. Ma J. i in. (2006). Comparative profiling of the sense and antisense transcriptome of maize lines. *Genome Biol.* Vol. 7, R22
94. MacIntosh G.C. i in. (2001). Identification and analysis of Arabidopsis expressed sequence tags characteristic of non-coding RNAs. *Plant Physiol.* Vol.127, 765–776
95. Macrae I. J. i in. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* Vol. 311, 195–198
96. Mallardo M. i in, (2008). Non-protein coding RNA biomarkers and differential expression in cancer: a review. *J. of Experimental & Clin. Cancer Res.* Vol. 27
97. Martens J.A. i in. (2004). Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* Vol. 429, 571–574
98. Mathy N. i in. (2007). 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* Vol. 129, 681-692
99. Mattick J.S. (2001). Non-coding RNAs: the architect of eukaryotic complexity. *EMBO* Vol. 2, 986-991
100. Mlotshwa S. i in. (2009). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends in Plant Science.* Vol. 13, 375-382
101. Mohanty B.K. i Kushner S.R. (2000). Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' → 5' exonuclease and poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *PNAS* Vol. 97, 11966-11971
102. Moss E.G. i in. (1997). The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. elegans* and is Regulated by the lin-4 RNA. *Cell* Vol.88, 637-646
103. Mroczek S. i Kufel J. (2008). Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast. *Nucl. Acids Res.* Vol. 36, 2874-2888
104. Mullen T.E. i Marzluff W.F (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev.* Vol. 22, 50-65
105. Nashimoto N. (1993). 3' truncated tRNA^{Arg} is essential for *in vitro* specific cleavage of partially synthesized mouse 18S rRNA. *Nucl. Acids Res.* Vol. 21, 4696-4702
106. Nguyen V.T. i in. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* Vol. 414, 322–325
107. O'Donnell K.A I Boeke J.D. (2007) Mighty Piwis Defend the Germline against Genome Intruders. *Cell* Vol. 129, 37-44

108. Orban T.I. i Izaurralde E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* Vol. 11, 459-469
109. Park M.Y. i in. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Plants. Annu. Rev. Plant Biol.* Vol.102, 3691-3696
110. Parker R. and Sheth U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol. Cell*, Vol. 25
111. Peragine A. i in. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* Vol. 18, 2368–2379
112. Phillips J.R. (2007). The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Letters* Vol. 581, 3592–3597
113. Pikaard C.S. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends in Plant Science.* Vol. 13, 390-397
114. Ponting C.P. i in. (2009). Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* Vol. 136, 629–641
115. Portnoy V. i in. (2005). RNA polyadenylation in Archea: not observed in Haloferax while the exosome polynucleotidylates RNA in Sulfolobus. *EMBO Rep.* Vol. 6, 1188-1193
116. Rajkowitsch L. i in. (2008). RNA chaperons, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol.* 4, 118-130
117. Ramachandran V. i Chen X. (2008a) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* Vol. 321, 1490-1492
118. Ramachandran V. i Chen X. (2008b) Small RNA metabolism in Arabidopsis. *Trends in Plant Science.* Vol. 13, 368-374
119. Rougemaille M. i in. (2008). THO/Sub2p functions to coordinates 3'-end processing with gene-nuclear pore association. *Cell* Vol.135, 308-325
120. Rymarquis L.A i in. (2008). Diamonds in the rough: mRNA-like non-coding RNAs. *Trends in Plant Science.* Vol. 13, 329-334
121. Saito K. i in. (2006). Specific association of Piwi with rasiRNA derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome. *Genes Dev.* Vol. 20, 2214-2222
122. Saxena S.K. i in. (2002). Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, 15142–15146.
123. Schaeffer D. i in. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 16, 56-62
124. Schneider C. i in. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *NAR* Vol. 37: 1127 - 1140
125. Schwede A i in. (2008). A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. *Nucleic Acids Res.* Vol. 36, 3374-3388

126. Selmer M. i in. (2006) Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA. *Science* Vol. 313: 1935
127. She M. i in. (2008). Structural basis of Dcp2 recognition and activation by Dcp1. *Mol. Cell* Vol. 29, 337-349
128. Sheth U. i Parker R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* Vol. 300, 805-808
129. Shin H. i in. (2006). Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J.* Vol. 45, 712–726
130. Shyu A.B. i in. (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degradate. *EMBO J.* Vol. 27, 471-481
131. Slomovic S. i in. (2006). Polyadenylation of ribosomal RNA in human cells. *Nucleic Acids Res.* Vol.34, 2966-2975
132. Souret F.F. i Green J.P. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell* Vol. 15, 173-183
133. Speer J. i in. (1979). tRNA breakdown products as markers for cancer. *Cancer* Vol. 44, 2120–2123
134. Stoecklin G. i in. (2006). ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Rep.* Vol. 7, 72-77
135. Stuhl K. (2007). Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 14, 103-105
136. Sugiyama R. i in. (2003). CCLS96.1, a member of a multicopy gene family, may encode a non-coding RNA preferentially transcribed in reproductive organs of *Silene latifolia*. *DNA Res.* Vol. 10, 213–220
137. Szczygłowski K, Hamburger D, Kapranov P, de Bruijn FJ (1997). Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin expressed sequence tag library and identification of novel nodule-specific genes. *Plant Physiol* Vol. 114, 1335-1346
138. Szymański M. i Barciszewski J. (2006) Regulatory RNAs in mammals. *Handb. Exp. Ph* (173), 45-72
139. Taghbalout i Rothfield (2008). RNase E and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. *J. Biol. Chem.* 283, 13850-13855
140. Teixeira D. i in. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* Vol. 11, 371-382
141. Teramoto H. i in. (1996). Noncoding RNA for CR20, a cytokininrepressed gene of cucumber. *Plant Mol. Biol.* Vol. 32, 797–808
142. Tomita K. i in. (2000) A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *PNAS* Vol. 97, 8278-8283

143. Thompson D.M. i in. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* Vol. 14, 2095-2103
144. Vagin V.V. i in. (2006). Distinct smallRNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, Vol. 313, 320-324
145. Van Dijk E i in. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA deccaping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* Vol. 21, 6915-6924
146. Varkonyi-Gasic E. i White D.W. (2002). The white clover enod40 gene family. Expression patterns of two types of genes indicate a role in vascular function. *Plant Physiol.* Vol. 129, 1107–1118
147. Vasilieva L. i in. (2008). The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 15, 794-805
148. Vaucheret H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 20, 759–771
149. Vazquez F. i in. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol. Cell* Vol. 16, 69–79
150. Voinnet O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* Vol. 136, 669-687
151. Wakiyama M. i in. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* Vol. 21(15), 1857–1862
152. Wang X. i in. (2008b). MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin. Genet.* Vol.74, 307-315
153. Wen J. i in. (2007). In silico identification and characterization of mRNA-like noncoding transcripts in *Medicago truncatula*. In *Silico Biology* Vol. 7, 0034
154. West S. i in (2006). Molecular dissection of mammalian RNA polymerase II transcriptional termination. *Mol. Cell* Vol. 29, 600-610
155. Wierzbicki A.T. i in. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/PolV mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* Vol. 135, 635-648
156. Willingham A.T. i in. (2005). A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* Vol. 309, 1570–1573
157. Wilusz C. J. i Wilusz J. (2004). Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet.* Vol. 20, 491–497
158. Wutz A. (2007). Xist function: bridging chromatin and stem cells. *Trends Genet.* Vol. 23, 457–464
159. Wutz A. i Gribnau J. (2007). X inactivation Xplained. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Vol. 17, 387–393

160. Xie Z. i in. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biol. Vol. 2, E104
161. Yan K.S. i in. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. Nature Vol. 426, 468–474
162. Yang W.C. i. in. (1993). Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. Plant J. Vol. 3, 573–585
163. Ying SY, Lin SL (2004). Intron-derived microRNAs-fine tuning of gene functions. Gene Vol.10,
164. Zeng Y. i Cullen B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. Nucleic Acids Res. Vol. 32, 4776-4785
165. Zhang B. i in. (2006). Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. Dev. Biol. Vol. 289
166. Zhang S., Li S., Kragler F. (2009). The Phloem-Delivered RNA Pool Contains Small Noncoding RNAs and Interfers with Translation. Plant Physiology Vol 150, 378-387
167. Zheng X. i in. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. EMBO J. Vol. 26, 1691–1701
168. Zhou Y. i in. (2009) High levels of tRNA abundance and alteration of tRNA charging by bortezomib in multiple myeloma. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 385, 160-164
169. Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res. Vol. 31 (13), 3406-15
170. Zundel M.A., Basturea G.N., Deutscher M.P. (2009). Initiation of ribosome degradation during starvation in *Escherichia coli*. RNA Vol. 15, 977-983

X. Załączniki

Tabela X.1. Człeczki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zaklasyfikowane jako produkty degradacji rRNA, kolorami oznaczono grupy homologicznych człeczek różniących się długością, pogrubionymi czcionkami wyróżniono substytucje nukleotydowe.

Nr	Sekwencja (5'-3')	długość	rRNA	RNA70	RNA18-73
1A	CGACGGGGUAUUGUAAGUGGCAGAGUG GCCUUGCUGCCACGAUCCACUGAGAUU CAGCCCUUUGUCGCUAAGAUUCGA	78	25S	+	
1B	CGACGGGGUAUUGUAAGUGGCAGAGUG GCCUUGCUGCCACGAUCCACUGAGAUU CAGCCCUUUGUCGCUAAG	72	25S	+	
1C	CGCGACGGGGUAUUGUAAGUGGCAGAG UGGCC	32	25S		+
1D	AUUCAGCCCUUUGUCGCUAAGAUUCGA	27	25S		+3
2A	CGAUUCGGGGCGUGGACCGACGCGGAU UACGGUGGCGGCCUAAGCCCGGGCC	52	25S	+	
2B	ACCGACGCGGAUUACGGUGGCGGCCUA AGC	30	25S		+
2C	ACCGACGCGGAUUACGGUGGCG	22	25S		+2
3	CGGGAAGAGUUAUCUUUUCTGUUUAAC AGCCUGCCCACCCUGG	43	25S	+	
4	AUGGCGCUUAAGCGCGGACCUAUACC CGGCCGUCGGGGCA	41	25S		+
5	UCAAAGUGAAGAAUUAACCAAGCGC GGGUAAACGGCGG	40	25S		+
6	CCACUGAGAUUCAGCCCUUUGUCGCUA AGAUUCGA	35	25S		+
7	UGUUGGUCGAUUAAGACAGCAGGACGG UGGUCAU	34	25S		+
8A	AUUGGCGGGAUCCUCGCGGGUGCACC GCC	30	25S		+
8B	CGGGUGCACCGCCGACCGAC	20	25S		+
9	AAGCCGGGUUACGGUGCCCAACUGCGC GCU	30	25S		+
10	AGAAGCGUCCUCAGCGACGGACCGGGC C	28	25S	+	+2
11	UGGUCAUGGAAGUCGAAAUCCGCUA	25	25S		+
12	AUGUCGGCUCUCCUAUCAUUGUGA	25	25S		+
13	ACGCGAGUUCUAUCGGGUAAAGCC	24	25S		+
14A	CGGGCGGAGGACAUUGUCAGG	21	25S		+
14B	CGGAGGACAUUGUCAGGU	18	25S		+
15	CGGGAGUAACUAUGACUCUC	20	25S	+	
16	CGGCGUUCGAAUUGUAGUC	19	25S	+	+2
17A	CAUGGGUAGUCGAUCCUAAGAG	23	25S		+
17B	CACAUGGGUAGUCGAUCC	19	25S	+	+2
17C	CACAUGGGUAGUCGAUC	18	25S		+
17D	CACAUGGGUAGUCGA	16	25S		+2
18	AAGACCCUGUUGAGCUUGA	19	25S	+	

19	CUAGAGGUGUCAGAAAAG	18	25S		+
20	CGGAGGAAAAGAAACUAA	18	25S		+2
21	AAAGGUUCCAUGUGAACG	18	25S		+
22	CGGACUGCUCGAGCUGC	17	25S		+
23	AACCGUUGAUUCGCACA	17	25S		+11
24	AUUCCCUUAGUACCG	16	25S		+
25	CGAUACUGACGUGCAA	16	25S		+
26	CAUUCAAAUUUCUGCCCUAUCAACUUU CGAUGGUAGGAUAGUGGCCUA	48	18S	+	
27	CGAAUGGCUCAUAAAUCAGUUAUAGU UUGUUUGAUGG	38	18S		+
28	CUAUGGGUGGUGGUGCAUGGCCGUUCU UAGUUGGU	35	18S	+	
29A	CCGCCC GCGACGUCGCGAGAAGUCCACU AAACCC	34	18S	+	
29B	CCCGCGACGUCGCGAGAAGUCCAC	24	18S		+
30A	AGUAUGGUCGCAAGGCUGAAACUUA GGAA	31	18S		+
30B	CAAGGCUGAAACUUA	17	18S		+
31	CCGCACGCGCGCUACACUGAUGUAUUC AAC	30	18S		+
32	UGAAGUGUUCGGAUCGCGGCGACGUGG GUGGU	32	18S	+	
33	CGAUCCUAUUGUGUUGGCUUCGGGAUC G	28	18S		+
34	CGCAUUUAUAGAUAAAAGGUCGACG	26	18S		+
35A	UCGGCGAUACGCUCCUGGUCU	21	18S		+2
35B	UCGGCGAUACGCUCCUGGUC	20	18S		+4
35C	UCGGCGAUACGCUCCUGGU	19	18S	+	+3
35D	UCGGCGAUACGCUCCUGG	18	18S	+	
36	CCCUUUGUACACACCGCCCG	20	18S	+	
37	AAGACGAUCAGAUACCGUC	19	18S	+	
38	CAUAGUAAGGAUUGACAGA	19	18S	+	+10
39	UGAAAUUCUUGGAUUUAU	18	18S	+	
40	CGGGUCGUGCCUCCGGCG	18	18S		+
41	UAAGCGCGAGUCAUCAGC	18	18S		+
42	CUCUUUCUUGAUUCUAUG	18	18S		+
43	CGCGGCGACGUGGGUGGU	18	18S		+
44	AUUUAUGAAAGACGAAC	17	18S		+
45	CAUGCAUGUGUAAGUA	16	18S		+
46	AAACUUAACCAGGUCC	15	18S		+
47A	AUGCGAUCAUACCAGCACUAAUGCACC GGAUCCCAUCAGAACUCCGCAGUUAAG CGUGCUUGGGCGAGAGUAGUACUAGGA UGGGUGACCUCCCGGGAAGUCCUCGUG UUGCAUCCCU	118	5S	+	
47B	UGCGAUCAUACCAGCACUAAUGCACCG GAUCCCAUCAGAACUCCGCAGUUAAGC GUGCUUGGGCGAGAGUAGUACUAGGAU GGGUGACCUCCCGGGAAGUCCUCGUGU UGCAUCCCU	117	5S	+	
47C	CAUACCAGCACUAAUGCACCGGAUCCCA UCAGAACUCCGCAGUUAAGCGUGCUUG	111	5S	+	

	GGCGAGAGUAGUACUAGGAUGGGUGAC CUCCCGGGAAGUCCUCGUGUUGCAUCCC U				
47D	CUAGGAUGGGUGACCUCCCGGGAAGUC CUCGUGUUGCAUCCCU	43	5S		+
47E	AUGCGAUCAUACCAGCACUAAUGCACC GGAUC	32	5S	+	
47F	CGAGAGUAGUACUAGGAUGGGUGA	24	5S		+2
47G	CGGGAAGUCCUCGUGUUGCAUCCC	24	5S		+3
47H	AAGUCCUCGUGUUGCAUCCCU	21	5S		+
47I	AAGUCCUCGUGUUGCAUCC	19	5S		+
47J	UCCUCGUGUUGCAUCCCU	18	5S		+
47K	CGAGAGUAGUACUAGGA	17	5S		+
47L	UCCUCGUGUUGCAUCCC	17	5S	+	
48A	CAUCCCGAACUUGGUGGUAAAACUCUA CUGCGGUGACGAUACUGUAGGGGAGGU CCUGCGGAAAAAUAGCUCGACGCCAGG AU	83	5S	+	
48B	UCCUGCGGAAAAAUAGCUCGACGCCAG GAUGA	32	5S		+
48C	UCCUGCGGAAAAAUAGCUCGACGCCAG GAUG	31	5S		+4
48D	UCCUGCGGAAAAAUAGCUCGACGCCAG GAU	30	5S	+	+4
48E	CGGUGACGAUACUGUAG	17	5S		+
49	GGCCUCACGGUCUAAAAGUUAUGG	24	5S		+
50	CGGUACCAAUCGAGGCAAACUCUGAA UACUAGAUUGACCUC	44	23S		+
51	GACUGUUUACCAAAAA	16	23S		+
52	CAGUGACCAGGCCCG	15	23S		+
53A	GGGCAGGUUCUACGCGUACUCACCC GUCCGCCACUGGAAACACCACUCCCGU CCGACUUGCAUGUGUUAAGCAUGCCGC CAGCGUUCAU	92	16S	+	
53B	UCUCAUGGAGAGUUCGAUCCGGGCUCA GGAUGAACGCUGGCGGCAUGC	48	16S	+	
54A	UGAAGUCGUAACAAGGUAGCCGUAGGG GAACCUCCGGCUGGAUACCUCUU	52	16S	+	
54B	GCGGCUGGAUACCUCUUUCU	22	16S		+
55A	AGUCUUUGAACGCAAGUUGCGCCCAA GCCUUCUGGCCGAGGGCACGUCUGCCU GGGUGUCACA	64	5,8S	+	
55B	CCUGGGUGUCACACUGUAGGCACUGAA ACGUAACCUGCAUGGGGCCACCA	50	5,8S		+
55C	GGCCGAGGGCACGUCUUGCCUGGGUGU CACA	31	5,8S		+
55D	CCGAGGGCACGUCUGCCUGGGUGUCAC A	28	5,8S	+	+19
55E	CCGAGGGCACGUCUGCCUGGGUGUCA	26	5,8S		+12
55F	GCACGUCUGCCUGGGUGUCACA	22	5,8S		+
55G	CCGAGGGCACGUCUGCCUGGG	21	5,8S	+	+4
56A	UAUGCAGCUGAGGCAUCCUAACAGACC GGUAGACUUGAAC	40	4,5S		+3
56B	CAGCUGAGGCAUCCUAACAGACCGGUA	36	4,5S		+3

	GACUUGAAC				
56C	CCGGUAGACUUGAAC	15	4,5S		+
57	AAGGUCACGGCGAGACGAGCCGUUUAU C	28	4,5S		+5

Tabela X.2. Cz steczki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zaklasyfikowane jako produkty degradacji tRNA cytoplazmatycznych, kolorami oznaczono grupy homologicznych cz steczek ró ni cych si długo ci ; K – koniec tRNA zawarty w analizowanym produkcie degradacji, C – chromosom, w którym ulokowany jest gen koduj cy tRNA, * - delecja nukleotydu; pogrubion czcionk wyró niono substytucje nukleotydowe.

Nr	Sekwencja (5'-3')	CCA	długo nt	tRNA/ antykodon	K	C	RNA70	RNA18-73
58	UCAAACGAUUGUGG GUUC**GUCCCACCG GGCUGUG	CCA	37	Arg/TCT	3'	2		+
59	AAAAGGUCGUGGGU UCGGCUCCCACUGU GGUCG	CCA	36	Arg/TCG	3'	5		+4
60A	GCAGAAGGUCGUAG GUUC**CCCGCUACC UGACGCG	CCA	37	Arg/CCT	3'	5		+
60B	GCAGAAGGUCGUAG GUUC	-	18					+
61	CCAGAGAUUCUGGG UUCGGUCCCCAGUG AAGUCUG	CAA	38	Arg/ACG	3'	2	+	
62	ACUCUGGGUUCGUU CCCCAGUGGAGUCG	CCA	31	Arg/ ACG	3'	2	+	
63	GUCCCACCGGGUGU G	CCA	18	Arg/TCT	3'	1		+3
64A	CGGAGCGGGAGAUU GUGGGUUCGAGUCC CACCGUGGUCG	CCA	42	Arg/CCG				+
64B	GCGGGAGAUUGUGG GUUCGUGUCCCACC GUGGUCGUCA	CCA	41		3'	1		+
64C	AGAUUGUGGGUUCG UGUCACACCGUGGU CGCCA	CCA	33				+	
65	CAAUAGGUCACCGG UUCGAAUCCGGUAG GGCCCU	CCA	37	Cys/GCA	3'	2		+
66	CGAGAGGUCACCGG UUCGUACCCGGUUG GGCCCU	CCA	37	Cys/GCA	3'	1		+
67	GAGCCUAUAGCUCA GUGGUAGAGCAAU GA	-	30	Cys/GCA	5'	2		+
68A	UCCUAGCUNAGUG GUAGAGCAAUUGAC UGC	-	31	Cys/GCA	5'	3	+	
68B	UCCAUAACUCAGUG GUAGAGCAUUUGA	-	27				+	
69A	UAGAAUAGUACCCU GCCACGGUACAGAC CCGGGUUCGUUCC CGGCUGGUGCA	CCA	56				+	

69B	GGUACAGACCCGGG UUCGUUUCGCCGCU GGUGCA	CCA	37	Gly/GCC	3'	5		+
69C	CGGUACAGACCCGG GUUCGUUUCGCCG UGGUGCA	C	36				+	
69D	UACAGACCCGGGU CGUUUCGCCGUGG UGC	-	31				+	
69E	CAGACCCGGGUUCG UUUCGCCGUGGUG CA	CCA	33					+2
69F	ACCCGGGUUCGUUU CCCGGUGGUGCA	CCA	29				+	
70A	GCACCAGUGGUCUA GUGGUAGAAUAGUA CC	-	30		5'		+	
70B	CCAGUGGUCUAGUG GUAGAAUAGUACC	-	27				+7	
70C	CUAGUGGUAGAAUA GUACCCUGCCACG	-	27			+		
70D	AGUGGUCUAGUGGU AGAAUAGUACC	-	25			+		
70E	CUAGUGGUAGAAUA GUACC	-	19				+3	
71	AAAGCGUCUGUAGU CCAACGGUUAGGAU	-	28	Gly/TCC	5'	5		+
72A	AGUGGUCUAGUGGC AUGAUAGUACC	-	25	Gly/GCC	5'	5	+	
72B	CUAGUGGCAUGAUA GUAC	-	18					+2
73A	CGGUACUGACCAGG GUUCGUUUCGCCG AUGCGCA	CC	37	Gly/CCC	3'	5		+
73B	CGGUACUGACCAGG GUUCGUUUCGCCG AUGCGC	-	34					+3
73C	CAGGGUUCGUUCC CUGGAUGCGCA	CCA	28					+7
73D	CAGGGUUCGUUCC CUGGAUGCGC	-	24				+	
74	AUGUCUACGCUGGU UCAAAUCCAGCUCG GC	CCA	33	Tyr/GTA	3'	3		+
75A	UCGCUGGUUCGUUU CCGGCAGGUCGGA	CCA	30	Tyr/GTA	3'	4	+	
75B	CGCUGGUUCGUUUC CGGCAGGUCGGA	CCA	29				+	
75C	CUGGUUCGUUCCG GCAGGUCGGA	CCA	28				+	
76	UUUAGCUCAGUUGG UAGAGC	-	20	Tyr/GTA	5'	1	+	
77A	CGUGGGUUCAUAUC CCACAGUUGUCA	CCA	29				+	

77B	CGUGGGUUCAUAUC CCACAGUUGUCA	CC	28	Leu/TAG	3'	4		+
77C	CGUGGGUUCAUAUC CCACAGUUGUC	-	25					+
78A	CGUGGGUUCAGAUC CCACUGUCAACA	-	26	Leu/AAG	3'	5		+2
78B	CGUGGGUUCAGAUC CCACUGUCA	-	23					+2
79	UGGUGUAGUGGUUA UCACUUUUGCCUU	-	27	Val/TAC	5'	5		+
80A	GCGAGAGGUCCCCGA GUUCAUUUCUCGGA AUGCCCC	CCA	38	Pro/AGG	3'	5		+
80B	CCGAGUUCAUUUCU CGGAAUGCCCC	CCA	28					+
81A	GGGUGUUUGGUCUA GUGGUAUGAUUCUC GCUU	-	32	Pro/CGG				+2
81B	GGGUGUU**GUCUAG UGGUAUGAUUCUCG CU	-	29					+2
81C	GGGUGUU**GUCUAG UGGUAUGAUUCUCG C	-	28		5'	3		+
81D	GGGUGUU**GUCUAG UGGUAUGAUUCUCG	-	27					+
81E	GGGUGUUUGGUCUA GUAGUAUGAUUCGC GCU	-	31					+
82	CUUGUGGUCGUGGG UUCGUGCCCCACGG UGGGCG	CCA	37	Lys/CTT	3'	5		+
83	CCGUGGGUUCGUUC CCCACAGACGGCG	CCA	30	Lys/TTT	3'	5		+
84A	UCCAGCGGUUAGGA UAUCUGGCUUUCAC CCAGGAGACCCGGG UUCGUUCCCCGGCA ACGGAG	CCA	65	Glu/ TTC	3'	3	+	
84B	UCACCCAGGAGACC CGGGUUCGUUUC GGUAACGGAG	CCA	41					+
85	CAGGAUACUCGGCU CUCACCCGAGAGGC CCGGGUUCGUGUCC CGGCAACGGAA	CCA	56	Glu/CTC	3'	5	+	
86	CGAGAGACCCGGGU UCGUGUCCCGGCAA CGGAG	CCA	36	Glu/ CTC	3'	5		+
87A	CAAUAGACCCGGGU UCGGCUCCCGGCAG ACGCA	-	33	Glu/ TTC	3'	5		+
87B	CAAUAGACCCGGGU UCGGCUCCCGGCAG	-	32					+

	ACGC							
88	GCGGGAGGUCUUGA GUUCAGCUCUCAAC GAAAGCA	CCA	38	Thr/AGT	3'	4		+
89	ACUGAAGGUCCGUA GUUCGAUUCUGCGU GUGGGC	-	34	Thr/TGT	3'	5		+2
90	GGGGGUGUAGCUCA UAUGGUAGAGC	-	25	Ala/CGC	5'	5		+
91A	GCGAGAGGCACGGG GUUCGUUCCCCGC ACCTCCA	CCA	38		3'	5		+
91B	CACGGGGUUCGUUU CCCCGCAUCUCCA	CCA	30					+
91C	UUCGUUCCCCGCA UCUCCA	CCA	23					+
92	AUCGUUACCCCGCA UCUCCA	CCA	23	Ala/AGC	3'	5	+	+
93	AUGUAGCUCAGAUG GUAGAGC	-	21		5'			+2
94A	GUCACGCGGGUGAC CCGGGUUCGUUCCC CGGCAACGGCG	CCA	42	Asp/GTC	3'	5		+
94B	ACGCGGGUGACCCG GGUUCGUUCCCCGG CAACGGCG	CCA	39					+
94C	CGCGGGUGACCCGG GUUCGUUCCCCGGC AACGGCG	CCA	38					+
94D	GCGGGUGACCCGGG UUCGUUCCCCGGCA ACGGCG	CC	36					+2
94E	CGUUCCCCGGCAAC GGCG	CCA	21					+
95	UCGUUGUAGUAUAG UGGUAAGUAUUCCC GC	-	30				5'	
96A	AAGCUGCGGGUUCG AGCCCCGUCAGUCC CG	CCA	33		Asp/GTC	3'	2	
96B	CGAGCCCCGUCAGU CCCCG	CCA	21					+
97A	AUUGUAGUUCAAU GGUCAGAGCACCGC C	-	29	5'				+
97B	AUUGUAGUUCAAU GG	-	16				+	
98A	UCAGAAGGUUGCGU GUUCGUUUCACGUC GGGUUCA	CCA	38	Trp/CCA	3'	5		+
98B	UCAGAAGGUUGCGU GUUCGUUUCACGUC GGGUUCA	-	35					+9
98C	UCAGAAGGUUGCGU	-	34					+5

	GUUCGUUUCACGUC GGGUUC								
98D	UCAGAAGGUUGCGU GUUCGUUUCACGUC GGG	-	31					+	
98E	AAGGUUGCGUGUUC GUUUCACGUCGGGU UC	-	30					+3	
98F	UUGCGUGUUCGUUU CACGUCGGGUUCA	CCA	30				+		
98G	UCAGAAGGUUGCGU GUUC	-	18					+	
99A	AACGUGGGUCUCCA AAACCCAAUGUCGU AGGUUCAAUCCUA CAGAGCGUG	CCA	54	Trp/CCA	3'	2	+		
99B	CCAAUGUCGUAGGU UCAAUCCUACAGA GCGUG	CCA	36					+	2
99C	CAAUGUCGUAGGUU CAAUCCUACAGAG CGUG	CCA	35					+	
99D	UCGUAGGUUCAAU CCUACAGAGCGUG	CCA	30					+	4
99E	UCGUAGGUUCAAU CCUACAGAGCGUG	CC	29					+	
99F	UAGGUUCAAUCCU ACAGAGCGUG	CCA	27					+	
100	ACCGAGGGUUCGAA UCCUCUCUUUC	-	26				Ser/GGA	3'	2
101	UUCGUACCCUGCUG UUGACG	-	20	Ser/TGA	3'	1		+	
102	GUGGCUGUAGUUUA GUGGUAAGAAUCC ACG	-	31	HisGTG/	5'	5	+		
103	UCGCGUGUUCGAUC CACGCUCACCGCA	CCA	30	Phe/GAA	3'	5		+ 2	
104	CAAUCCAAUAGUA GGUA	CCA	21	Met/CAT	3'	2		+	
105	AAGGUCGCAGGUUC GUAACCUGCAUGGG CCA	CCA	34	Ile/AAU	3'	5	+		
106	UCGUAGGUUCAAU CCUACCUGGGGA	-	26	Asn/ GTT	3'	2		+ 2	

Tabela X.3. Cz steczki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zaklasyfikowane jako produkty degradacji tRNA organelowych, kolorami oznaczono grupy homologicznych cz steczek ró ni cych si długo ci ; K – koniec tRNA zawarty w analizowanym produkcie degradacji, * - delecja nukleotydu; pogrubion czcionk wyró niono substytucje nukleotydowe.

Nr	Sekwencja (5'-3')	CCA	długo nt	tRNA/ antykodon	K	RNA70	RNA18 -73
107	UUCGAAUCCCUCCUCG CCCA	CCA	23	Arg/ACG	3'		+ 2
108	CAAUCCGGGUGCCGC CU	CCA	21	Cys/GCA	3'		+ 2
109A	AGAAGACGCGGGUUC GAUCCCCGCUAUCCGC C	CCA	35	Gly/GCC	3'		+
109B	AGAAGACGCGGGUUC GAUCCCCGCUAUCCGC	-	31				+
109C	ACGCGGGUUCGAUCC CGCUAUCCGCC	CCA	30			+	
109D	AUCCCCGCUAUCCGCC	CCA	19				+
110	UAGGUUCGAAUCCUCG CUCUCCAC	CCA	28	Mito Tyr/GTA	3'		+
111	AAAAUCCGUUGACUU UAAAAUCGUGAGGG UUCAAGUCCCUAUC CCCA	CCA	53	Leu/TAA	3'	+	
112A	GGGGAUAUGGCGGAA UUGGUAGACGCUACG GACUUA	-	37		5'	+	
112B	AUAUGGCGGAAUUGG UAGACGCUACGGAUU U	-	31		5'	+	
113A	AGACUCAAAAUCUCGU GCUAAAGAGCGUGGA GGUUCGAGUCCUCUUC AAGGCA	-	53	Leu/CAA	3'	+	
113B	CGAGACUCAAAAUCUC GUGC AAAAGAGC	-	28				+
113C	CGGGAGGUUCGAGUCC U	-	18				+
114A	AGAGCAUCUCGGUUCG AGUCCGAGUAGC	-	28	Leu/TAG	3'	+	
114B	CGAGUCCGAGUAGCUG GUA	CCA	22				+
115	GGGAUAUAACUCAGC GGUAGAGUGUCACCU	-	30	Val/GAC	5'		+
116	CUACGGUUCGAGUCCG UAUAGCCCUA	CC	28	Val/TAC	3'		+
117A	UUCAAGGAGGCAGCG GGGAUUCGACUUCCCC UGGGGGUA	CC	41	Glu/CTC (antsens)	3'		+
117B	CAAGGAGGCAGCGGG GAUUCGACUUCCCCUG GGGGUA	CCA	40			+	+

117C	CAGCGGGGAUUCGACU UCCCCUGGGGGUA	CCA	32				+
117D	CGACUU*CCCUGGGGG UA	CCA	21				+
118A	UAAGCCAUCGGUUCA AAUCCGAUAAGGGGC U	CCA	34	Thr/GGT	3'	+	
118B	CAAAUCCGAUAAGGG GCU	CCA	21				+ 3
119A	AUAUAGCUCAGUUGG UAGAGCUCCGCUCUUG CAA	-	34	Ala/TGC	5'		+
119B	UAGCUCAGUUGGUAG AGCUCCGCUCUUGCAA	-	31				+
119C	AUAUAGCUCAGUUGG UAGAGCUCCGC	-	26				+
120A	CAGUGGAUUGUGAAU UCACCAUCGCGGGUUC AAUCCCGUCGUUCGC CC	CA	51	His/GTG	3'	+	
120B	UUCAAUCCCGUCGUU CGCCC	CA	23				+
121	UCACCAGUUCAAAUCU GGUUCUUGGC	-	26	Phe/GAA	3'		+
122A	UGAUUGGGCGUAGGU UCGAAUCCUACUUGGG GAG	CCA	37	Asn/GTT	3'		+
122B	AUUGGUCGUAGGUUC GAAUCCUACUUGGGG AG	CCA	35				+
122C	CGAAUCCUACUUGGGG AG	CCA	21				+
123	CAAUCCUACUGGAUG CA	CCA	21	Ile/AAT	3'		+
124A	GCGAGGUCUCUGGUUC AAAUCCAGGAUGGCC A	CCA	36	Ile/GAT	3'		+2
124B	CGAGGUCUCUGGUUCA AAUCCAGGAUGGCCCA	CC	34			+	
124C	CAAAUCCAGGAUGGCC CA	CCA	21				+

Tabela X.4. Cz stezki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zaklasyfikowane jako produkty degradacji mRNA, kolorami oznaczono grupy homologicznych cz stezek ró ni cych si długo ci ;
C – chromosom, pogrubion ezcionk wyró niono substytucje nukleotydyowe.

Nr	Sekwencja (5'-3')	długo nt	pozycja/mRNA	C	RNA70	RNA18 -73
125A	UCCAUGACGUUCCUGA UGC UA	21	5'UTR DNA repair protein Rad4 family (AT5G16630)	5		+
125B	UCCAUGACGUUCCUGA UGC	20		5		+
126	ACGGACUGGGAAAUC AAGCCAGCUAGUGCCC CUGGA	36	egzon hypothetical protein (AC000103)	1		+
127	CAGCAAUCAACAGAGA CCUAAUCAGU AAC	29	egzon/intron ketol-acid reductoisomerase (AT3G58610)	3		+
128	AUGGUUUUUUCAUGA A	17	mitochondrial pseudogene (At2g07686)	2		+
129A	CUGCCCCGGGUUCCUC AUUCUCU	23	egzon Lecithin:cholesterol acyltransferase family protein / LACT family protein (AT1G27480)	1		+
129B	CUGCCCCGGGUUCCUC AUUCU	21		1		+
130	AGUCAUUGUGUCUCA	15	egzon unknown protein (AT1G57777)	1		+
131	CAAGGUCAUGUAGUUC AAAUCUACUUAAGCU UA	33	egzon homolog of yeast autophagy 18 (ATG18) h (AtATG18h)	1		+
132A	GCGAGAGGUCCCGAGU UCAUUUCUCGGAAUGC CCCCCA	38	egzon mRNA for mutT like protein (At1g68760)	1		+
132B	CCGAGUUCAUUUCUCG GAAUGCCCCCA	28		1		+
133	UGUUCAGUUUAUGGAC GGUACGAUUUGGUU	30	egzon oxidoreductase N- terminal domain- containing protein (AT1G66130)	1		+
134	AUGGUUCUCUUUUCGA A	17	intron caleosin-related family protein (AT1G70670)	1		+
135	AUGUUGAUAAAUUUUC UGUCCGU	23	Intron Putative protein (AT4g34070)	4		+

136	AUCGGGGAUAGCUGUG C	17	egzon Mutator-like transposase (At2g14030)	2		+
137	AAGGUCCUGAACGAUG UGCUGAC	23	egzon putative non-LTR retroelement reverse transcriptase (At2g01840)	2		+
138	CUGC UCCUAGUACGAG AGGACCGGA	25	5'UTR aldose 1-epimerase family protein (AT5G66530)	5	+	
139	AAAGGAGGAAGGAACA AAGCAGUGCUCUCGUU UCAUUUUUCUCCUUU C	49	5'UTR protein binding / zinc ion binding (AT4G39140)	4	+	
140	AUUGGCGGGAUCCUC GCGGGUGCACCGCC	30	5' UTR mRNA (At3g41950)	3	+	
141	UCGGAAGAGGAUUUUG CGG	19	intron glucose-6-phosphate dehydrogenase (AT5G35790)	5		+

Tabela X.5. Cz steczki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zwi zane z biogenez małych niekoduj cych RNA (ncRNA), kolorami oznaczono grupy homologicznych cz steczek ró ni cych si długo ci .

Nr	Sekwencja (5'-3')	długo nt	ncRNA	RNA70	RNA18-73
142	AGAAAGCCCACUAAGAUAG CUUGCUAUCUGGGCUUUCA CGAGUCGCCCAUGCGUUGCA CUACUGCACGGGCCUGGCUC AACCCGCC	86	(U2.3) ncRNA (AT3G57765)	+	
143	CGAGAGACCGAUUUGAAA UUGUCGGGAG	29	small RNA Ath_wt_09433 (1-13) small RNA Ath_wt_20370 (14-29)		+
144	AAGUUUCCUCAGGAUAGU AGAAGCUC	27	small RNA Ath_wt_13668	+	
145	GGGUCAGCGCUCUGACGAA GAUGG	24	small RNA AGO4_09775		+
146	CAUUCGGUCAUAUGGUACA UUC	23	small RNA AGO4_06864		+
147	ACUGGUAACAGCGGGUG CAA	22	small RNA Ath_wt_03405		+ 2
148A	UGAAAGUGACUACAUCGGG GU	21	pre-mi161 (AT1G48267)		+
148B	UUGAAAGGACUACAUCGGG A	20			+
148C	AAAGUGACUACAUCGGGG	18			+
149	CGCAAGUGAAAUACCACUA	19	small RNA Ath_wt_21944	+	+ 38
150A	CGGACUGCUCGAGCUGCU	18	small RNA Ath_wt_17407		+ 2
150B	CGGACUGCUCGAGCUGC	17		+	+ 11
151	CAUUAACUAUUUCUUUAU	18	small RNA Ath_wt_17630		+
152	AGGCGGUCUAUUGCUGG	18	(U4.2) ncRNA (AT3G06900)		+
153	UGGGGGCCGGCGAUGCG	17	small RNA Ath_wt_14605		+
154	CAUCUUUCUAUUGGCAGG	18	MIR399C (AT5G62162) precursor transcript		+

Tabela X.6. Cz steczki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zaklasyfikowane jako transkrypty rejonów mi dzygenowych, kolorami oznaczono grupy homologicznych cz steczek ró ni cych si długo ci ; pogrubion czcionk wyró niono substytucje nukleotydowe..

Nr	Sekwencja (5'-3')	chromosom/ genom	długo nt	RNA70	RNA18 -73
155A	CUGAAAGCAUCUAAGUAG UAAGCCCACCCCAAGAUGA GUGCUCUCCU	chloroplastowy	47		+
155B	CAAGAUGAGUGCUCUCCU		18		+
156	ACAUGACAACCAUAACU AC/AU/CUUUGUUGGUGUA UUGGUAACA	2 /odcinki 1-22 i 20-36 kodowane oddzielnie/	44		+
157	AAGAAGGAAGCUAUAAGU AAUGCAACUAUGAA	chloroplastowy /antysens/	32		+
158	UAGACUCUAAAAUACCC UUGGUACUUUA	chloroplast /antysens/	29	+	+
159	AAGAAAGAUCGUUUUUAG AUCAUCAAGU	2	28		+
160	AGAGGGAACGAAACUGUU GAAUGA	5	24		+
161	GAAAAAGAACUCUUCGUG AAAAGA	5 Rejon centromeru	24		+
162	CUUAAAAGUAGGUCUGCG AGGAAG	1 /antysens/	24		+
163	GUUAAAGACUACUGAUGG AGAUGC	5	24		+
164	GCACUUCUCACGUACAAGG CACUU	2	24		+
165	AGGAAGCGAGGGAUGAGA UGCUGA	2	24		+
166	AAUCUGAAAAUACCGCAG CGUAGC	2	24		+
167	AACGAAAUUGGCAAGGUG AAGAAG	2 /sens/antysens/	24		+
168	AGGUUCGAAUCCUCCGUC CCAGC	chloroplast	24	+	
169	AUAUUAAUCUCGUUUAA UUAUA	2	23		+
170	CCAUAGGCGACAAGUGUC UCAGA	5	23		+
171	AGAGUAUCUCACUGAUGG AAAUG	1	23		+
172	ACGACGUCGUUUAUUGAG AGACA	2	23		+
173	AGCUGAGUUUGAUCGGUG CAUUG	2 /antysens/	23		+
174	CAGAAGGUUCUGGGCCGA AUCC	3	22		+
175	CUGCACAAUUUGGUGCCG GUGA	1	22		+
176	CGCUUCCCGGAUGGUGCA	1	21		+

	CCA				
177A	ACGGACUGGGAUCCCCGG GCG	DNA telomerów	21		+ 2
177B	ACGGACUGGGAUCCCCGG GC		20		+ 3
177C	CGGGCUGGGAUCCCCGGG CG		20		+
178	GUUCCCCAUAGACUGCGCC A	1	20		+
179	CAAAGUGAAGAAAAAAAA A	1 /antysens/	19		+
180	AGAGAUACAAUAUUGGGA	2	18		+
181	CAAAAUUGUGAUUAAUAC	2	18		+ 2
182	UCGAAGGUUCGAUCCUU	1	18		+
183	AGUGUCACAUGUGUGCG	2	17		+
184	AUGUAUAGAAUAAAA	4	16		+

Tabela X.7. Cz steczki biblioteki RNA70 oraz RNA18-73 zaklasyfikowane jako małe regulatorowe RNA; pogrubion czcionk wyró niono substytucje nukleotydowe.

Nr	Sekwencja (5'-3')	długo nt	miRNA	RNA70	RNA18 -73
185	UCCACAGCUUUCUUGGA CUG	21	MIR396A (AT2G10606)		+
186	UGAAGCUGCCAGCAUAGU CUA	21	MIR 167b (FM163798.1)		+
187	AGAAUCUUGAUGAUGCUG CAU	21	MIR 172b (FM163922.1)		+
188	AUGGUAGUUCAAGUAUUC CA	20	TAS2 RNA (AT2G39681) trans-acting siRNA2 precursor		+