

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej



Dawid Kubiak

Rozprawa doktorska

**Powstawanie i funkcje granul stresowych w stresie niedotlenienia
u roślin ze szczególnym uwzględnieniem roli m6A
(N6 - metyloadenozny)**

Promotor:

dr hab. Janusz Niedojadło, prof. UMK

Toruń, 2024

Składam serdeczne podziękowania

Panu dr hab. Januszowi Niedojadło, prof. UMK

*za nieocenione wsparcie, zarówno merytoryczne, jak i naukowe,
w trakcie realizacji badań, opracowywania wyników oraz tworzenia rozprawy.
Szczególnie dziękuję za pomoc i życzliwość w chwilach trudności,
zarówno zawodowych, jak i prywatnych.*

Pani dr hab. Katarzynie Niedojadło, prof. UMK

*za pomoc w prowadzonych badaniach oraz cenne wskazówki,
które miały istotny wpływ na jakość mojej pracy.*

Panu mgr Michałowi Świdzińskiemu

*za wsparcie techniczne i stworzenie
przyjaznej atmosfery sprzyjającej pracy naukowej.*

***Koleżankom i kolegom,
pracownikom Katedry Biologii Komórkowej i Molekularnej***

*za wsparcie, przyjazną atmosferę i poczucie wspólnoty,
które motywowały mnie do dalszego działania*

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI	5
FINANSOWANIE	6
WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
STRESZCZENIE	9
ABSTRACT.....	12
1. WSTĘP	15
1.1 STRES NIEDOTLENIENIA U ROŚLIN	15
1.2 GRANULE STRESOWE	16
1.3 MECHANIZM POWSTAWANIA SGs	17
1.4. CHARAKTERYSTYKA SKŁADU SGs	19
1.5 ZWIĄZEK POMIĘDZY SGs A CIAŁKAMI P (Z ANG. PROCESSING BODY).....	22
1.6 EPITRANSKRYPTOM – NOWY MECHANIZM REGULACJI EKSPRESJI GENÓW	23
1.7 BIAŁKA REGULUJĄCE METABOLIZM I FUNKCJĘ M6A	24
1.8 KOMPLEKS METYLUJĄCY M6A	25
1.9 ODWRACALNOŚĆ METYLACJI M6A - DEMETYLAZY	26
1.10 BIAŁKA ROZPOZNAJĄCE M6A	26
1.11 WPŁYW M6A NA METABOLIZM RNA	28
1.12 FUNKCJA N6- METYLOADENOZYNY W ODPOWIEDZ NA STRES HIPOKSJI I POWSTAWANIE SGs ..	30
2. CEL PRACY	33
3. MATERIAŁY	34
3.1 MATERIAŁ BADAWCZY	34
3.2 OLIGONUKLEOTYDY	34
3.3 PRZECIWCIAŁA	36
3.4 ODCZYNNIKI	36
3.5 BUFORY I MIESZANINY	39
4. METODY	42
4.1 HODOWLA ROŚLIN	42
4.1.1 <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i>	42
4.1.2 KULTURA <i>IN VITRO</i> <i>A. THALIANA</i>	42
4.2 WSTĘPNE PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU	43
4.3 KRZYŻOWANIE MUTANTÓW <i>A. THALIANA</i>	43
4.4 INHIBICJA TRANSLACJI I TRANSPORTU JĄDROWO-CYTOPLAZMATYCZNEGO.....	44
4.5 IZOLACJA GRANUL STRESOWYCH.....	45
4.6 ANALIZY MIKROSKOPOWE	45

4.6.1 PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO OBSERWACJI MIKROSKOPOWYCH.....	45
4.6.2 HYBRYDYZACJA <i>IN SITU</i> I IMMUNOLOKALIZACJA.....	47
4.6.3 MIKROSKOPIA.....	49
4.7 ANALIZY TRANSKRYPTOMICZNE.....	50
4.7.1 IZOLACJA RNA.....	50
4.7.2 IZOLACJA POLI(A) RNA.....	51
4.7.3 FRAGMENTACJA POLI(A) RNA.....	51
4.7.4 IMMUNOPRECYPITACJA M6A.....	52
4.7.5 ODWROTNA TRANSKRYPCJA I REAKCJA QPCR.....	53
4.7.6 PRZYGOTOWANIE BIBLIOTEK cDNA.....	54
4.7.8 SEKWENCJONOWANIE I ANALIZA BIOINFORMATYCZNA.....	55
4.7.9 OCENA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA KWASÓW NUKLEINOWYCH.....	56
4.8 ANALIZY STATYSTYCZNE.....	57
5. WYNIKI.....	59
5.1 POWSTAWANIE GRANUL STRESOWYCH W KORZENIACH ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO (<i>L. ANGUSTIFOLIUS</i>) W TRAKCIE STRESU NIEDOTLENIEŃ.....	59
5.2 WPLYW CYKLOHEKSYMIDU NA POWSTAWANIE GRANUL STRESOWYCH W KORZENIACH <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i>	63
5.3 ANALIZA DWUSTREFOWEJ STRUKTURY GRANUL STRESOWYCH.....	66
5.4 ROLA GRANUL STRESOWYCH W OKRESIE POWROTU DO WARUNKÓW FIZJOLOGICZNYCH.....	70
5.5 PRZESTRZENNE I STRUKTURALNE POWIĄZANIA SG Z CIAŁAMI P.....	73
5.6 ZMIANY TRANSKRYPTOMICZNE W KORZENIACH <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i> W ODPOWIEDZI NA STRES NIEDOTLENIANIA.....	75
5.7 LOKALIZACJA WYBRANYCH MRNA W KOMÓRKACH KORZENI <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i> ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM GRANUL STRESOWYCH.....	81
5.8 LOKALIZACJA M6A W KORZENIACH <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i>	90
5.9 ZMIANY POZIOMU METYLACJI M6A WYBRANYCH MRNA PODCZAS STRESU NIEDOTLENIEŃ.....	95
5.10 METYLACJA TRANSKRYPTOMU KORZENI <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i> W PODCZAS STRESU NIEDOTLENIEŃ I POWROTU DO WARUNKÓW FIZJOLOGICZNYCH.....	97
5.11 WPLYW M6A NA POWSTAWANIE I SEKWESTRACJĘ POLI(A) RNA W SG U <i>A. THALIANA</i>	105
6. DYSKUSJA.....	110
6.1 ODPOWIEŹ NA STRES HIPOKSJI NA POZIOMIE TRANSKRYPTOMU.....	110
6.2 POWSTAWANIE I FUNKCJA GRANUL STRESOWYCH W WARUNKACH NIEDOTLENIEŃ.....	113
6.3 CHARAKTERYSTYKA CIAŁ DWUSTREFOWYCH JAKO NOWEGO TYPU CIAŁ STRESOWYCH U ROŚLIN.....	115
6.4 UDZIAŁ M6A W ODPOWIEDZI NA STRES NIEDOTLENIEŃ ORAZ BIOGENEZĘ SGs U ROŚLIN.....	117
7. LITERATURA.....	122

WYKAZ PUBLIKACJI

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Kubiak D, Szczesniak MW, Ostrowska K, Bielewicz D, Bhat SS, Niedojadło K, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Fray RH, Niedojadło J (2023) Interplay between m6A modification and overall transcripts quantity: Impacts on mRNA composition in plant stress granules. bioRxiv 2023.12.14.569339 (w trakcie recenzji Journal of Experimental Botany)

Inne publikacje:

Jankowska M, Augustyn B, Maliszewska J, Przeździecka B, **Kubiak D**, Chelchowska O, Kaczorek J, Knop D, Krajnik K, Kletkiewicz H, Kęsy J, Rogalska J, Stankiewicz M (2023) Sublethal biochemical, behavioral, and physiological toxicity of extremely low dose of bendiocarb insecticide in *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae). Environmental Science and Pollution Research 30.(16), 47742-47754

Deleńko K, Nuc P, **Kubiak D**, Bielewicz D, Dolata J, Niedojadło K, Górka S, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulińska Z, Niedojadło J (2022) MicroRNA biogenesis and activity in plant cell dedifferentiation stimulated by cell wall removal. BMC Plant Biology 22

Górka S, **Kubiak D**, Ciesińska M, Niedojadło K, Tyburski J, Niedojadło J (2022) Function of Cajal Bodies in Nuclear RNA Retention in *A. thaliana* Leaves Subjected to Hypoxia. International Journal of Molecular Sciences 23(14), 7568

FINANSOWANIE

Badania, na których opiera się niniejsza rozprawa doktorska, zostały zrealizowane dzięki finansowaniu z grantu Narodowego Centrum Nauki:

„Udział mechanizmów epitranskryptomicznych w funkcjonowaniu granul stresowych (SG) u roślin uprawnych poddanych stresowi abiotycznemu”

(PRELUDIUM 21 nr 2022/45/N/NZ9/04015)

WYKAZ SKRÓTÓW

ADH1 – Dehydrogenaza alkoholowa 1

ALKBH – Homolog AlkB

ALKBH9B – Homolog 9B AlkB

ATP – Adenozyno-5'-trifosforan.

BMM – Mieszanina metakrylanu butylu i metakrylanu metylu.

CDS – sekwencja kodująca

CK2 – Kinaza kazeinowa 2

CLuc – RNA wzorcowe (bez m6A)

Ct – Cykl progowy

DEPC – Pirowęglan dietylu

eIF2 α – Eukariotyczny czynnik inicjacji translacji.

EXPA11 – Ekspansyna 11

EXPA13 – Ekspansyna 13.

FAO – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa.

FPKM – liczba fragmentów na tysiąc par zasad transkryptu na milion zmapowanych odczytów.

GLuc – RNA wzorcowe (z m6A)

GO – Ontologia genów.

IDRs – Inherentnie nieuporządkowane regiony

IP – immunoprecypitacja

LLPS – Separacja faz ciecz-ciecz

LR Gold – Żywica LR Gold

L37 – Białko rybosomalne L37

L44 – Białko rybosomalne L44

m6A – N6-metyloadenozyna

mRNA – Matrycowe RNA

MeRIP – Immunoprecypitacja metylowanego RNA

MTA – Metylotransferaza A

PAB2 – Białko wiążące poli(A)

PB – ciało P

PCA – Analiza głównych składowych

PCR – Reakcja łańcuchowa polimerazy

PrLD – Domeny prionopodobne

RPB1 – Podjednostka 1 polimerazy RNA II.

RBP – Białka wiążące RNA

rRNA – RNA rybosomalne

RT-qPCR – Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

SGs – Granule stresowe

STORM – Mikroskopia stochastycznej rekonstrukcji optycznej

SUS1 – Syntaza sacharozy 1

SUS4 – Syntaza sacharozy 4

TAE – TRIS-octan-EDTA

TES – Miejsce zakończenia transkrypcji

TSS – Miejsce startu transkrypcji

UBC – Ubikwityna C

YTH – Domeny homologii YT521-B

XTH – Endotransglukozylaza/Hydrolaza.

STRESZCZENIE

Ze względu na osiadły tryb życia, przetrwanie stresu wywołanego czynnikiem abiotycznym, wymaga od roślin dynamicznej adaptacji do zmieniających warunków środowiska. Jest to możliwe między innymi przez przestrzenną regulację ekspresji genów z udziałem granul stresowych. Granule stresowe (z ang. stress granules; SGs) to nieoblone biokondensaty powstające w cytoplazmie komórek narażonych na stres biotyczny i abiotyczny. Te bogate w białka i poli(A) RNA struktury są miejscem występowania transkryptów nieulegających translacji. Odłączanie mRNA od rybosomów i ich akumulacja w SG może stanowić mechanizm umożliwiający syntezę jedynie tych białek, które są kluczowe do przetrwania w warunkach stresu. Jak dotąd jednak nie udało się jednoznacznie ustalić funkcji SG oraz ich związku z tolerancją na stres. Nieznany jest również mechanizm selektywnej sekwestracji transkryptów w SG ani dalszy los zgromadzonego na ich terenie mRNA. Podejrzewa się, że modyfikacje epitranskryptomowe, takie jak N6-metyloadenozyna (m6A), mogą wpływać na lokalizację komórkową mRNA. Jednakże do tej pory nie prowadzono badań nad rolą m6A w organizacji transkryptomu SG u roślin.

Dlatego celem niniejszej pracy było poznanie natury i funkcji granul stresowych w komórkach korzeni *L. angustifolius* (łubinu wąskolistnego) i *A. thaliana* podczas stresu hipoksji (niedotlenienia), natomiast szczegółowymi zadaniami badawczymi były:

- identyfikacja i badania etapów powstawania SG oraz poznanie struktury i dystrybucji molekuł na ich terenie,
- badania zmian transkryptomu łubinu w odpowiedzi na stres hipoksji oraz podczas powrotu do warunków fizjologicznych,
- poznanie zmian ilości m6A na poziomie epitranskryptomu łubinu.
- określenie roli m6A w powstawaniu SG.

Przeprowadzone badania wykazały, że podczas niedotlenienia w komórkach korzeni *L. angustifolius* dochodzi do powstawania SG bogatych w poli(A) RNA i białka PAB2. Stwierdzono, że SG formują się w cytoplazmie w odpowiedzi na stres, początkowo jako małe biokondensaty, które z czasem łączą się w większe struktury. Badania ilościowe dotyczące poli(A) RNA przez cały okres trwania hipoksji wykazały, że transkrypty z cytoplazmy przemieszczają się do SG.

Analizy z udziałem, m.in. mikroskopii wysokorozdzielczej (STORM) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) ujawniły charakterystyczną dwustrefową strukturę SG,

dotychczas nieopisaną w literaturze. SG składają się z pierścienia bogatego w poli(A) RNA i PAB2 oraz centralnej strefy wolnej od tych molekuł, w której obecne są rybosomy.

Wykazano, że po ustaniu działania czynnika stresowego, podczas ponownego natlenienia roślin dochodzi do demontażu SG. Porównując poziomy poli(A) RNA w komórkach korzeni a także blokując transport jądrowo-cytoplazmatyczny transkryptów podczas stresu i reoksygenacji ujawniono, że SG są głównym źródłem zwiększającej się ilości mRNA w cytoplazmie i jest to poziom transkryptów wystarczający dla funkcjonowania komórki podczas pierwszych godzin po ponownym natlenieniu.

Badania RNA-seq ujawniły bardzo silną odpowiedź na indukcję i zakończenie stresu niedotlenienia na poziomie transkryptomu korzeni łubinu. Zidentyfikowano 21 036 genów różnicowo ekspresowanych w czasie niedotlenienia. Do dalszych analiz wyznaczono transkrypty wśród genów odpowiedzi na stres oraz o obniżonej ekspresji podczas hipoksji. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę MeRIP-Seq, co pozwoliło zidentyfikować zmiany w rozmieszczeniu i poziomie m⁶A w obrębie transkryptów. Ustalono, że m⁶A występuje głównie w końcu 3' we wszystkich transkryptach a poziom tej modyfikacji zwiększał się w początkowym okresie trwania hipoksji a następnie malał w trakcie wydłużonego czasu niedotlenienia, co może być związane z regulacją stabilizacji mRNA.

Następnie stosując techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH oraz MeRIP-qPCR wykazano, że transkrypty regulujące hipoksję, na przykład ADH1 i HUP7 charakteryzują się niskim poziomem m⁶A a dodatkowo ADH1 występuje tylko w części centralnej SG, gdzie obserwowano rybosomy. Z kolei, mRNA genów niezwiązanych z niedotlenieniem było silnie wzbogacone w m⁶A i transkrypty były obecne w obu strefach SG.

Dalsze badania nad rolą modyfikacji m⁶A w formowaniu i funkcjonowaniu SG przeprowadzono u mutantów *A. thaliana* o wysoce obniżonym poziomie m⁶A. W wyniku braku zajścia procesu metylacji adenozyliny obserwowano spadek liczby SG oraz zawartości poli(A) RNA na ich terenie.

Uzyskane wyniki wskazują na istotny udział m⁶A w odpowiedzi na stres hipoksji, zarówno związanej z regulacją ilości mRNA ale także z przechowywaniem transkryptów na okres po zakończeniu stresu w SG. Te dwa zjawiska mogą odbywać się równocześnie ale w różnych rejonach komórki. Wykazanemu w pracy spadkowi ilości pewnych mRNA w cytoplazmie poza SG towarzyszy wzrost poziomu m⁶A w hipoksji. Natomiast, w SG modyfikacja ta jest niezbędna dla rekrutacji części mRNA do granul stresowych. W celu

ochrony mRNA przed degradacją w SG na późniejszych etapach odpowiedzi na stres niedotlenienia, ALKBH9B może demetylować transkrypty. Tak przechowany mRNA w SG może być wykorzystywany po zakończeniu stresu do szybkiej translacji. Wynika z tego, że rola m⁶A w odpowiedzi na stres hipoksji u roślin jest bardzo złożona. Wraz z mechanizmami, które podczas transkrypcji metylują adenozyne w pozycji 6 oraz działania demetylaz ważnym aspektem funkcjonowania tej modyfikacji jest lokalizacja komórkowa poszczególnych mRNA.

ABSTRACT

Due to their sessile lifestyle, plants must dynamically adapt to changing environmental conditions to survive abiotic stresses. This adaptation, among other mechanisms, is achieved through the spatial regulation of gene expression involving stress granules. Stress granules (SGs) are non-membranous biocondensates that form in the cytoplasm of cells exposed to biotic or abiotic stress. These structures, rich in proteins and poly(A) RNA, serve as reservoirs for untranslated transcripts. The dissociation of mRNA from ribosomes and its sequestration in SGs may represent a mechanism that prioritizes the synthesis of proteins essential for survival under stress conditions. Despite their significance, the exact roles of SGs and their connection to stress tolerance remain unclear. The mechanisms governing the selective sequestration of transcripts into SGs and the fate of stored mRNAs are also poorly understood. It has been hypothesized that epitranscriptomic modifications, such as N6-methyladenosine (m6A), may influence the cellular localization of mRNA. However, no studies to date have explored the role of m6A in the organization of the SGs transcriptome in plants.

This study aimed to investigate the nature and function of SGs in root cells of *Lupinus angustifolius* (narrow-leaved lupin) and *Arabidopsis thaliana* under hypoxic (low oxygen) stress. Specific objectives included:

- identifying and analyzing the stages of SGs formation and exploring their structure and the distribution of molecules within them.
- examining transcriptomic changes in *Lupinus* in response to hypoxic stress and during recovery to normal physiological conditions.
- investigating alterations in m6A levels at the epitranscriptomic level in *Lupinus*.
- determining the role of m6A in the formation of SGs.

The research revealed that SGs enriched with poly(A) RNA and PAB2 proteins form in the root cells of *L. angustifolius* during hypoxia. It was observed that SGs develop in the cytoplasm as a response to stress, initially appearing as small biocondensates that gradually merge into larger structures. Quantitative analyses of poly(A) RNA throughout the hypoxic period showed that cytoplasmic transcripts relocate to SGs during stress.

Analyses using high-resolution microscopy technique STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) and Transmission Electron Microscopy (TEM) revealed a previously unreported two-zoned SGs structure. SGs consist of a ring rich in poly(A) RNA and PAB2, surrounding a central zone devoid of these molecules but containing ribosomes.

It was demonstrated that upon cessation of hypoxic stress, during plant reoxygenation, SGs disassembled. By comparing the levels of poly(A) RNA in root cells and blocking the nuclear-cytoplasmic transport of transcripts during both stress and reoxygenation, it was revealed that SGs act as the primary source of increasing cytoplasmic mRNA levels. This pool of transcripts is sufficient to support cellular functions in the initial hours following reoxygenation.

RNA-seq analysis revealed a strong transcriptomic response to both the induction and cessation of hypoxic stress in the roots of *Lupinus*. A total of 21,036 differentially expressed genes were identified during hypoxia. For further analysis, transcripts associated with stress response genes and those showing reduced expression during hypoxia were selected. In the subsequent research phase, MeRIP-Seq analysis was performed, which enabled the identification of changes in the distribution and levels of m6A modifications across transcripts. It was found that m6A predominantly localized at the 3' end of all transcripts. The level of this modification increased in this part of transcripts during the initial phase of hypoxia but subsequently decreased during prolonged hypoxic conditions, suggesting a potential role in regulating mRNA stability.

Using fluorescence in situ hybridization (FISH) and MeRIP-qPCR, it was shown that hypoxia-related transcripts, such as *ADHI* and *HUP7*, exhibit low levels of m6A. Notably, *ADHI* localized exclusively in the central SGs zone, where ribosomes were observed. In contrast, mRNA of non-hypoxia-related genes was highly enriched in m6A and present in both SGs zones.

Further investigations into the role of m6A modifications in the formation and function of SGs were conducted using *Arabidopsis thaliana* mutants with significantly reduced levels of m6A. The absence of adenosine methylation resulted in a decreased number of SGs and a lower poly(A) RNA content within them.

The findings highlight the significant role of m6A in hypoxic stress responses. m6A contributes to both the regulation of mRNA levels and the storage of transcripts in SGs for post-stress recovery. These two processes may occur simultaneously but in different regions of the cell. The observed decrease in certain mRNA levels in the cytoplasm outside SGs during hypoxia was accompanied by an increase in m6A levels. Conversely, within SGs, m6A is essential for recruiting specific transcripts. To protect mRNA from degradation in SGs during the later stages of the hypoxic stress response, *ALKBH9B* may demethylate transcripts. This preserved mRNA can then be rapidly translated once the stress ends. These findings suggest that the role of m6A in the plant hypoxia response is highly complex. In addition to the

transcriptional mechanisms that methylate adenosine at position 6 and the actions of demethylases, the cellular localization of individual mRNA transcripts is a crucial aspect of the function of this modification.

WSTĘP

1.1 STRES NIEDOTLENIEŃIA U ROŚLIN

Dostępność tlenu jest kluczowym czynnikiem determinującym życie większości organizmów. Gdy jego dostępność jest niewystarczająca, dochodzi do zakłócenia procesów komórkowych, co w skrajnych przypadkach kończy się ich śmiercią. Chociaż rośliny stanowią główne źródło tlenu uwalnianego do atmosfery, ich metabolizm w dużej mierze zależy od dostępności tego gazu w środowisku. W przeciwieństwie do zwierząt, rośliny nie posiadają aktywnego systemu dystrybucji tlenu (Sasidharan i Mustroph, 2011). Tym bardziej dla tych organizmów jego dostępność ze środowiska ma kluczowe znaczenie (Drew, 1997; Bailey-Serres i Voesenek, 2008). Niedobór tlenu w środowisku zewnętrznym jest najczęściej efektem ulewnych deszczy i powodzi, które prowadzą podtopienie korzeni lub całkowitego zanurzenie roślin. W takich warunkach jego dyfuzja do tkanek roślinnych jest utrudniona, co prowadzi do obniżenia natlenienia tkanek (Armstrong, 1979; Sasidharan i Mustroph, 2011). Gdy stężenie tlenu spada do poziomu ograniczającego proces oddychania tlenowego (zazwyczaj w zakresie 0,5–5%), dochodzi do zjawiska niedotlenienia, znanego również jako hipoksja (Sasidharan i wsp., 2017).

W ostatnich dziesięcioleciach na skutek globalnych zmian klimatu wzrosła częstotliwość ekstremalnych zjawisk pogodowych często o przeciwstawnej naturze, takich jak susze i powodzie. Według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), w latach 2005–2015 straty w sektorze rolniczym krajów rozwijających się, spowodowane powodziami, wyniosły około 19 miliardów dolarów (FAO, 2015). Prognozy wskazują, że do 2050 roku ryzyko związane z powodziami może wzrosnąć trzykrotnie (Jongman i wsp., 2012).

Nadmierny poziom wody wywołuje nie tylko niedobór tlenu, ale również zmniejsza ilość światła docierającego do roślin i zmienia właściwości gleby. Beztlenowe warunki sprzyjają denitryfikacji, prowadząc do ograniczenia dostępności azotu w glebie (Yu i wsp., 2019). Ponadto, utrudniona wymiana gazowa skutkuje nagromadzeniem się produktów ubocznych oddychania beztlenowego, takich jak CO₂, metan czy hormony gazowe. Obniżenie pH gleby w tych warunkach pociąga za sobą szereg dodatkowych negatywnych skutków (Dat i wsp., 2006). Nadmiar wody sprzyja także rozwojowi mikroorganizmów, w tym wielu patogenów roślinnych, co znacznie komplikuje regenerację roślin po ustąpieniu stresu (Gravot i wsp., 2016). Zmiany metabolizmu roślin oraz środowiska otaczającego podczas hipoksji

prowadzą zatem do pogorszeni wzrostu i rozwoju a długotrwałe niedotlenienie może prowadzić do śmierci. Aby ograniczyć straty w rolnictwie oraz przeciwdziałać skutkom powodzi w uprawach, konieczne jest pogłębienie wiedzy o mechanizmach adaptacyjnych roślin do stresu. Jest to jednym z ważnym wyzwani dla współczesnej biologii komórkowej i molekularnej.

1.2 GRANULE STRESOWE

Ekstremalne warunki środowiskowe wymagają wyjątkowych reakcji na wielu poziomach w tym również genomu, aby zwiększyć adaptację do stresu. Rośliny są organizmami osiadłymi, których miejsce życia wyznacza miejsce kiełkowania, dlatego tym bardziej wymagają szerokiej możliwości reagowania na warunki środowiskowe. Prowadzi to zazwyczaj do mocnej odpowiedzi na poziomie transkryptomu. Jednak synteza RNA jak wykazano jest prowadzona często z obu nici DNA a także z regionów promotorowych czy sekwencji wzmacniających aktywność genów (Djebali i wsp. 2012; Hon i wsp. 2017). Wynika z tego, że sam proces transkrypcji w dużym stopniu jest stochastyczny. Stąd wzrasta znacznie mechanizmów po transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Wśród nich jednym z ważniejszych jest dostępność mRNA do rybosomów. Reguluje to retencja mRNA w jądrze komórkowym i kumulacja w cytoplazmatycznych granulach stresowych (SG) (Niedojadło i in. 2014, 2016, Sorenson i Bailey-Serres 2014). Ponieważ translacja jest procesem niezwykle energochłonny ma to istotne znaczenie podczas warunków stresowych.

Nover i współpracownicy (1983) po raz pierwszy opisali powstawanie cytoplazmatycznych granul w odpowiedzi na stres cieplny w trakcie badań na komórkach pomidora. Składały się one głównie z białek szoku cieplnego i nietranslatowanych mRNA (Nover i wsp. 1989). Wkrótce potem, obecność granul złożonych z białek szoku cieplnego zaobserwowano u zwierząt w fibroblastach zarodków kurzych i komórkach HeLa narażonych na stres cieplny (Collier i Schlesinger, 1986; Arrigo i wsp. 1988). Kolejnym ważnym krokiem było opisanie przez Kedersha i współpracowników (1999) warunków stresowych indukujących powstawanie cytoplazmatycznych skupisk w komórkach ssaczy. Ich skład obejmował przede wszystkim poliadenylowane RNA oraz liczne białka rdzeniowe. Ze względu na specyficzne warunki prowadzące do ich powstania, skupiska te zostały określone mianem granul stresowych (ang. stress granules, SGs).

Granule stresowe to nieoblionione struktury cytoplazmatyczne o wielkości od 100 do 2000 nm powstające najprawdopodobniej na skutek zatrzymania procesu translacji mRNA (Moser i Fritzler, 2010). Stanowią element ewolucyjnie konserwowanego mechanizmu odpowiedzi komórkowej na stres wywołany czynnikami biotycznymi oraz abiotycznymi. U

roślin, SGs powstają w odpowiedzi na rozmaite czynniki stresowe, w tym m.in. zasolenie, skrajne temperatury, niedotlenienie czy wirusy, a następnie ulegają demontażowi po ustąpieniu stresu. (Maruri-Lopez i wsp. 2021; Sorenson i Bailey-Serres, 2014; Reuper i wsp. 2021). Powrót do warunków fizjologicznych inicjuje w komórkach fazę regeneracji w trakcie której dochodzi do przywrócenia zatrzymanej translacji oraz wznowienia mechanizmów związanych ze wzrostem. Na istotną rolę SGs w odpowiedzi na stres wskazuje kilka dotychczasowych badań przeprowadzonych na komórkach zwierzęcych. Zaburzenie powstawania SGs u danio przegowanego zakłóciło regenerację po ustąpieniu stresu cieplnego, co w efekcie doprowadziło do obniżenia przeżywalności w porównaniu z grupą kontrolną (Zampedri i wsp. 2016). Podobne obserwacje poczyniono w przypadku komórek ludzkich, gdzie mutacje w genach kodujących białka SGs uniemożliwiały ich formowanie, tym samym ograniczając zdolność regeneracji (Kwon i wsp. 2007).

Wyniki badań u roślin wskazują także na istotną rolę SG w odpowiedzi na warunki stresowe. Nadekspresja *UBPIB* (białko występujące w SG) prowadziła do zwiększenia ilości granul stresowych oraz wyższej tolerancji na stres cieplny. Natomiast mutanty *ubp1b* *A.thaliana* charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na stres solny, cieplny i osmotyczny (McCue i wsp. 2012; Nguyen i wsp. 2016). Interesującym przykładem jest białko HSP101, które podczas stresu cieplnego silnie akumuluje w SGs u *A. thaliana*. Przy czym HSP101 jest niezbędnym białkiem opiekuńczym dla przeżycia roślin poddanych stresowi cieplnemu (McLoughlin i wsp., 2019). Zatem obecność w SGs białek kluczowych dla odpowiedzi na stres wskazuje, że nie są one jedynie strukturami magazynującymi, ale mogą pełnić funkcję centrów koordynujących reakcję na bodźce stresowe.

Powstawanie SGs oraz sekwestracja mRNA i białek w tych strukturach mogą odgrywać kluczową rolę w tolerancji na stres. Jednak obecnie jest wciąż za mało informacji żeby jednoznacznie zweryfikować tę hipotezę.

1.3 MECHANIZM POWSTAWANIA SGs

Dotychczasowe badania przeprowadzone na komórkach ssaczy i drożdżach umożliwiły opracowanie modelu powstawania granul stresowych, obejmującego trzy kluczowe etapy: 1) nukleację, 2) utworzenie gęstego rdzenia, zawierającego podstawowe składniki SGs, oraz 3) formowanie dynamicznej otoczki, połączone z fazą wzrostu i fuzji (Jain i wsp., 2016; Markmiller i wsp. 2018). Należy zaznaczyć, że zarówno tempo, jak i liczba powstających SGs zależą od rodzaju, intensywności oraz czasu trwania stresu (Kedersha i wsp. 2002; Wallace i wsp. 2015).

W początkowej fazie działania czynnika stresowego dochodzi do zahamowania procesu translacji na skutek fosforylacji eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (z ang. eukaryotic initiation factor 2, eIF2 α), który uważany jest za kluczowy element wyzwalający proces montażu SGs (Kedersha i Anderson, 2002). Fosforylacja eIF2 α powoduje dysocjację kompleksów inicjacji translacji z polisomów, prowadząc do ich rozpadu i uwolnienia RNA do cytoplazmy (Wolozin, 2012). Powstające wysokie lokalne stężenie kompleksów mRNP indukuje pierwsze etapy nukleacji SGs (Protter i Parker, 2016). Proces ten jest modulowany przez liczne oddziaływania białko-białko, RNA-RNA i RNA-białko, a także modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne (Sanders i wsp. 2020; Protter i Parker 2016). Jednakże najważniejszą rolę w etapie nukleacji odgrywa RNA. Mechanizm leżący u podstaw kondensacji SGs opiera się na odwracalnym zjawisku separacji faz ciecz-ciecz (z ang. liquid-liquid phase separation, LLPS). Polega on na oddzielaniu i agregacji białek i kwasów nukleinowych ze środowiska wodnego, prowadząc do utworzenia bezbłonowych organelli zdolnych do gromadzenia składników w stężeniach nawet trzystukrotnie wyższych niż w otaczającym je środowisku (Banani i wsp., 2017). Obecnie tego typu struktury nazywamy biokondensatami. Poprzez parowanie zasad Watsona-Cricka oraz niekanoniczne interakcje pomiędzy RNA wyzwalają LLPS i promują montaż SGs *in vitro* (Van Treeck i Parker, 2018).

W kolejnym etapie, w wyniku nukleacji, dochodzi do miejscowego nagromadzenia podstawowych składników SGs, takich jak G3BP1 (z ang. GTPase-activating protein-binding protein 1), TIA-1 (z ang. T-cell intracellular antigen-1) oraz PABP1 (z ang. polyadenylate-binding protein 1). Składniki te wiążą się zarówno ze sobą, jak i z poliadenylowanymi mRNA oraz podjednostkami rybosomalnymi 40S, co prowadzi do rekrutacji dodatkowych białek i inicjacji agregacji stabilnego rdzenia SGs (Khong i wsp., 2017). Jak dotąd, wszystkie poznane białka rdzeniowe indukujące LLPS u ssaków, drożdży i roślin charakteryzują się wielodomenową strukturą. Zwykle obecne w nich są domeny oligomeryzacji, domeny wiążące RNA, inherentnie nieuporządkowane domeny (z ang. intrinsically disordered domains, IDD) oraz domeny prionopodobne (z ang. prion-like domains, PrLD) (Sanders i wsp. 2020). U roślin wśród zidentyfikowanych dotychczas kanonicznych białek SGs znalazły się między innymi białko wiążące RNA – Rbp47 (z ang. RNA-binding protein 47) oraz białko wiążące poli(A) – PAB2 (z ang. poly(A) binding protein 2) (Bhasin i Hülskamp, 2017). Co ciekawe w trakcie agregacji rdzenia SGs, istotne znaczenie ma zarówno rodzaj zgromadzonego RNA jak i jego struktura drugorzędowa. Specyficzne konfiguracje mRNA mogą selektywnie odsłaniać lub ukrywać komplementarne sekwencje w celu interakcji z innymi RNA, determinując tworzenie kompleksów w SGs (Langdon i wsp. 2018). Z kolei niektóre RNA pełnią funkcję rusztowań

dla białek RBP, promując powstawanie SGs poprzez interakcje RNA-RBP (Van Treeck i wsp., 2018).

Dotychczas opisane SGs, strukturalnie stanowią dwufazowe skupiska składające się z kilku gęstych rdzeni o średnicy około 200nm zanurzonych w mniej skoncentrowanej i dynamicznej otoczce o zmiennych rozmiarach (Youn i wsp. 2019). Jednakże u roślin nie wykazano silnych skupisk białek w SG przypominających rdzenie tych struktur u ssaków. W komórkach zwierząt po utworzeniu stabilnego rdzenia SGs, białka RBP poprzez wysokie lokalne stężenie inherentnie nieuporządkowanych regionów (z ang. intrinsically disordered regions, IDRs) rekrutują dodatkowe białka, które promują LLPS i umożliwiają formowanie otoczki. Zazwyczaj rekrutowane są białka specyficzne dla otoczki, które nie wykazują aktywności wiązania RNA, a ich obecność zależy od rodzaju stresu, typu komórki lub organizmu (Markmiller i wsp., 2018; Riggs i wsp., 2020). Następnie po wytworzeniu otoczki, następuje fuzja SGs, prowadząca do powstania wielordzeniowych struktur o rozmiarze do 2 μm (Lin i wsp., 2015). Rdzeń i otoczka SGs różnią się zarówno pod względem dynamiki, jak i składu u różnych organizmów oraz stresu (Jain i wsp. 2016; Gutierrez-Beltran i wsp. 2021). Rdzeń, dzięki silnym oddziaływaniom białko-białko, stanowi stabilną strukturę w obrębie SGs. Z kolei otoczka, w której interakcje między IDRs są słabsze i przejściowe, charakteryzuje się ciągłą wymianą składników z polisomami, co świadczy o jej dynamicznej naturze (Zhang i wsp. 2011; Wheeler i wsp. 2016). Pomimo kilku podobieństw do mechanizmów obserwowanych w komórkach zwierzęcych i drożdżach, wiedza na temat powstawania i organizacji SGs u roślin jest wciąż ograniczona. Brakuje szczegółowych informacji dotyczących między innymi kolejnych etapów formowania tych struktur, analizy budowy i ewentualnego rozróżnienia rdzenia i otoczki, a także procesów regulujących ich powstawanie.

1.4. CHARAKTERYSTYKA SKŁADU SGs

Pomimo istotnej roli SGs w funkcjonowaniu komórek roślinnych w trakcie stresu, ich skład w dalszym ciągu pozostaje słabo poznany. Brak błony otaczającej te struktury stanowi wyzwanie w procesie izolacji, a tym samym w badaniach nad identyfikacją ich składników. Na poszerzenie wiedzy na temat składu SGs wpłynęły badania przeprowadzone w ostatnich latach, wykorzystujące białka znacznikowe w procesach immunoprecypitacji w połączeniu z metodami chromatograficznymi i immunoprecypitacyjnymi (Kosmacz i wsp. 2019; Markmiller i wsp. 2018). Co niezwykle istotne skład SGs charakteryzuje się heterogennością, a obecność i rozmieszczenie poszczególnych składników może różnić się w zależności od rodzaju stresu (Jain i wsp. 2016; Wheeler i wsp. 2016). Dotychczas w bazie danych proteomu ssaczy SGs

opisano 637 białek (Nunes i wsp., 2019). Składa się on głównie z białek zawierających domeny sprzyjające agregacji, takich jak IDD, PrLD, RBP oraz ATPazy (Youn i wsp., 2018; Nunes i wsp., 2019). Najlepiej zbadanymi do tej pory integralnymi składnikami SGs u ssaków są przede wszystkim: podjednostka rybosomalna 40S, eukariotyczny czynniki inicjacji translacji eIF3 i 4G, białko wiążące poli(A) 1 (z ang. poly(A)-binding protein 1, PAB1), białka Ras-GAP wiążące domenę SH3 – G3BP1 i G3BP (z ang. Ras-GAP SH3 domain-binding protein) oraz białko TIA-1 (z ang. prion-related RNA-binding protein) (Kedersha i wsp. 2016; Huang i wsp. 2020). Z kolei u roślin zidentyfikowano 120 białek obecnych w SGs indukowanych stresem cieplnym. Spośród nich jedynie jedna czwarta posiada znane homologi w SGs ssaków i drożdży, co umożliwiło ich identyfikację (Kosmacz i wsp. 2019). Przykład stanowią białka znacznikowe SGs u *A.thaliana* – Rbp47b (z ang. RNA-binding protein 47b) oraz UBP1B (z ang. oligouridylate binding protein 1B), które są blisko związane z białkiem TIA-1 indukującym powstawanie SGs u ludzi (Kosmacz i wsp. 2018). Wśród zidentyfikowanych w SGs u *A. thaliana* białek, znalazły się także RBP, ATPazy, białka opiekuńcze oraz czynniki inicjacji i elongacji translacji (Kosmacz i wsp. 2019). W SG u roślin znaleziono również ewolucyjnie konserwowane białko ECT2, które bezpośrednio wiąże m6A. Natomiast spośród 16 białek, które wiążą się z Rpb47b w warunkach bezstresowych, 3 są związane z metabolizmem m6A, tj. ECT2, ECT4 i ALKBH5 demetylaza m6A. To silnie sugeruje udział m6A w biogenezie SG.

Oprócz białek w SGs zidentyfikowano również metabolity, takie jak aminokwasy, lipidy i nukleotydy (Kosmacz i wsp., 2019). Z jednej strony obecność tych molekuł może być przypadkowa, wynikająca z sekwestracji białek wraz z ich małowcząsteczkowymi ligandami. Z drugiej strony, może być intencjonalna i służyć regulacji dynamiki oraz funkcji SGs, jak w przypadku ATP, które jest niezbędne do aktywności białek opiekuńczych obecnych w SGs. Dodatkowo pełni rolę hydrotropu, który zapobiega tworzeniu się agregatów białkowych oraz rozpuszcza już istniejące skupiska na terenie SGs (Jain i wsp. 2016). Endogenne metabolity komórkowe są uważane za nowo wyłaniający się element biologii SGs.

Wcześniejsze badania nad SGs koncentrowały się głównie na analizie obecnych w nich białek oraz ich sekwestracji w kontekście odpowiedzi komórkowej na stres. Obecnie jednak coraz większe zainteresowanie badaczy wzbudza transkryptom SGs, który może odgrywać kluczową rolę w procesach związanych z formowaniem, stabilizacją oraz funkcjonowaniem tych struktur. Znaczenie akumulacji RNA w SGs potwierdza fakt, że stanowi ono aż 78–95% ich składu (Khong i wsp., 2017). Jak wcześniej wspomniano, proces powstawania SGs jest ściśle powiązany z uwolnieniem mRNA z polisomów. Zależność tę potwierdzają obserwacje

uzyskane po zastosowaniu cykloheksymidu, inhibitora elongacji translacji. Jego działanie zatrzymuje mRNA na rybosomach, co skutecznie uniemożliwia tworzenie SGs w odpowiedzi na stres. Powodem jest prawdopodobnie brak dostępności mRNA w cytoplazmie do tworzenia SG. Z tego powodu cykloheksymid stosuje się do pełnej identyfikacji SG w materiale poddanym stresowi. Z kolei użycie puromycyny, która prowadzi do całkowitej dysocjacji rybosomów, sprzyja formowaniu SGs (Kedersha i wsp., 2000). Powyższe obserwacje sugerują że mRNA gromadzone w granulach stresowych to głównie te, które nie podlegają translacji. Jednakże pomimo istotnego zahamowania procesu translacji w trakcie stresu, do SGs trafia zaledwie około 10% mRNA, co rodzi pytanie dotyczące selektywności gromadzonych transkryptów (Khong i wsp. 2017). Na poziomie funkcjonalnym większość transkryptów akumulowanych w SGs u zwierząt koduje białka rybosomalne. Natomiast nie stwierdzono obecności mRNA genów zaangażowanych w odpowiedź na stres, takich jak *HSP70* (z ang. heat shock protein 70) oraz *MDR1* (z ang. multidrug resistance 1) (Maruri-Lopez i wsp., 2021). Również w przypadku komórek drożdżowych transkrypty genów indukowanych stresem nie były kierowane do SGs (Zid i O'Shea, 2014). Podczas gdy w komórkach ssaków zidentyfikowano wiele mRNA związanych z SGs, wiedza na temat sekwestrowanych mRNA u roślin jest znikoma. Niemniej jednak Merret i współpracownicy (2017) w badaniach nad odpowiedzią *A.thaliana* na stres cieplny wykazali obecność w SGs mRNA kodujących białka rybosomalne oraz czynniki translacyjne. Zaobserwowano także, że w trakcie stresu cieplnego zmniejszała się ilość mRNA białek rybosomalnych związanych z polisomami, przy jednoczesnym wzroście ich interakcji z białkiem UBPl_a, markerem SGs. Całkowita ilość tych transkryptów pozostawała jednak niezmienną (Merret i wsp., 2017). Natomiast inne badania na *A. thaliana* dostarczyły pośrednich dowodów na potencjalną możliwość sekwestracji mRNA również genów odpowiedzi na stres w SGs (Tong i wsp., 2022; Kanodia i wsp., 2020; Yan i wsp., 2014). Yan i współpracownicy wykazali, że mRNA kodujące enzym biosyntezy kwasu giberelinowego GA200×3, którego ekspresja wzrasta w odpowiedzi na stres solny, jest wiązane i regulowane przez białko TSN, które występuje w SGs w trakcie stresu solnego. Autorzy zasugerowali, że TSN może rekrutować mRNA GA200×3 do SGs w celu jego stabilizacji i optymalizacji translacji, choć sama lokalizacja transkryptu w SGs nie została bezpośrednio zbadana. Z drugiej strony Sorenson i Bailey-Serres (2014) zaobserwowali, że transkrypty genów odpowiedzi na niedotlenienie, mimo silnej ekspresji w trakcie hipoksji, pozostawały związane z polisomami, a nie z UBPl_c. Wynika z tego że skład transkryptomu jest bardzo zróżnicowany u roślin i wymaga dalszych badań. Interesującym wydaje się weryfikacja danych transkryptomicznych przez lokalizację poszczególnych transkryptów w komórkach. Wzajemne

relacje pomiędzy RNA w SG i cytoplazmie przyczynią się do pełnego poznania funkcji badanych struktur.

Powyższe wyniki sugerują istnienie mechanizmów selektywnej sekwestracji mRNA do SGs, jednak proces odpowiedzialny za kierowanie poszczególnych transkryptów do tych struktur pozostaje nieznany. Niejasny jest również los mRNA akumulowanych w SGs. Badania przeprowadzone głównie na komórkach zwierzęcych wskazują, że zgromadzone w SGs transkrypty mogą być degradowane, przechowywane lub selektywnie kierowane do transportu do innych struktur cytoplazmatycznych (Chantarachot i in., 2018). Nadal brakuje także odpowiedzi na pytanie, co dzieje się z mRNA zmagazynowanym w SGs po zakończeniu działania czynnika stresowego i powrocie komórki do warunków fizjologicznych.

1.5 ZWIĄZEK POMIĘDZY SGs A CIAŁKAMI P (Z ANG. PROCESSING BODY)

Granule stresowe w komórkach eukariotycznych mogą współistnieć i wchodzić w interakcje z innymi cytoplazmatycznymi bezbłonowymi kompleksami mRNP, zwanymi ciałkami P (z ang. P-bodies, PB). W przeciwieństwie do SGs, obecność PB nie jest zależna od działania stresu, choć czynniki stresowe mogą wpływać na ich liczbę i wielkość. W skład PB wchodzi: białka związane z degradacją mRNA zależną od deadenylacji, białka egzozomu, elementy wyciszające RNA oraz białka zaangażowane w degradację transkryptów drogą NMD (z ang. Nonsense-mediated mRNA Decay) (Anderson i Kedersha, 2009; Xing i wsp., 2020). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że PB są miejscem degradacji mRNA w cytoplazmie. Jednak inne badania wykazywały, że mRNA akumulowane w PB mogą być stabilizowane, a także ponownie włączane do translacji, co podważa ich wyłącznie funkcję degradacyjną (Sheth i Parker, 2003; Kedersha i wsp., 2005; Chantarachot i Bailey-Serres, 2018; Hubstenberger i wsp., 2017).

Udział PB w regulacji mRNA oraz ich interakcje z SGs nadal budzą wiele wątpliwości. Badania dowodzą, że PB są fizycznie, kompozycyjnie i funkcjonalnie związane z SGs u eukariontów (Chantarachot i Bailey-Serres, 2018). Kedersha i współpracownicy (2005) przeprowadzili analizę mikroskopową interakcji SGs i PB w komórkach zwierzęcych z zastosowaniem fluorescencyjnych białek markerowych. Wykazali, że część SGs asocjowała z jednym lub kilkoma PB. Wynika z tego, że SG i PB stanowią osobne struktury cytoplazmatyczne aczkolwiek mogą współpracować podczas warunków stresowych.

Dotychczas pojawiło się również kilka sprzecznych informacji na temat kierunku potencjalnej wymiany składników białkowych oraz mRNA pomiędzy obiema strukturami (Buchan i wsp. 2008; Hondele i wsp. 2019; Wilbertz i wsp. 2019; Chantarachot i wsp. 2020).

Rola interakcji pomiędzy SGs a PB oraz ich kooperacja w odpowiedzi komórkowej na stres wymaga dalszych badań.

1.6 EPITRANSKRYPTOM – NOWY MECHANIZM REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

W ostatnich latach, dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej przyczynił się do ponownego zainteresowania chemicznymi modyfikacjami RNA, uznawanymi za kluczowy element złożonego mechanizmu regulacji ekspresji genów. Do tej pory zidentyfikowano ponad 170 rodzajów modyfikacji w RNA, które obecne są w rybosomalnym RNA (rRNA), transportującym RNA (tRNA), matrycowym RNA (mRNA) oraz niekodującym RNA (ncRNA) (Boccalletto i wsp., 2018). Podobnie jak w przypadku epigenomu modyfikacje RNA nie są kodowane genetycznie, wykazują odwracalny charakter i regulują los oraz ekspresję transkryptów. Ze względu na te właściwości, zbiorczo określa się je mianem epitranskryptomu (Hussain i wsp. 2013; Saletore i wsp. 2012).

Spośród dotychczas zidentyfikowanych modyfikacji RNA, najpowszechniej występującą w eukariotycznym mRNA jest metylacja atomu azotu w pozycji 6 pierścienia purynowego adeniny, znana jako N6-metyloadenozyna (m6A) (Liu i Pan, 2016; Yu i wsp. 2021). Mimo że m6A odkryto już w latach 70. XX wieku u ssaków i roślin, modyfikacja ta długo pozostawała niezbadana. Ograniczenia technik badawczych oraz brak bezpośredniego wpływu m6A na sekwencję RNA znacznie utrudniały detekcję oraz poznanie funkcji tej modyfikacji (Desrosiers i wsp., 1974; Kennedy i Lane, 1979). Dopiero w ostatnim czasie opracowanie zaawansowanych metod, takich jak MeRIP-seq (methylated RNA immunoprecipitation sequencing), umożliwiło precyzyjne mapowanie m6A w transkryptomie. Technika ta wykorzystuje wysoce specyficzne przeciwciała anty-m6A, które w reakcji immunoprecypitacji pozwalają na izolację fragmentów metylowanego mRNA, a następnie jego sekwencjonowanie (Dominissini i wsp., 2012; Meyer i wsp., 2012). Pierwsze badania z wykorzystaniem tej metody, przeprowadzone na komórkach ludzkich zidentyfikowały około 12 000 miejsc metylacji w ponad 7000 genach. Analiza sekwencji mRNA zawierających m6A wykazała, że u wszystkich zbadanych do tej pory eukariontów, większość modyfikacji znajduje się w obrębie wysoce konserwowanego motywu „RRACH” (R = A/G, H = A/C/U, A jako miejsce modyfikacji) (Dominissini i wsp., 2012; Parker i wsp., 2020; Arribas-Hernandez i Brodersen 2020). Mimo powszechności sekwencji „RRACH”, jedynie 1-5% tych miejsc jest rzeczywiście metylowanych, co wskazuje na selektywny charakter modyfikacji (Dominissini i wsp., 2012).

Rozmieszczenie miejsc metylacji w mRNA nie jest przypadkowe. Zarówno u zwierząt, jak i u roślin, m6A jest wzbogacane w regionach 3' niepodlegających translacji (3'UTR) oraz w pobliżu kodonu stop. Obserwuje się również zwiększone występowanie w obszarze kodonu start (Shen i wsp. 2016). Dodatkowo, lokalizacja m6A w obrębie transkryptów może być modulowana przez warunki środowiskowe. Na przykład, w warunkach stresowych u ssaków obserwowano znaczące wzbogacenie w m6A w regionie 5'UTR (Zhou i wsp., 2015).

Warto podkreślić, że m6A jest wysoce dynamiczną modyfikacją, a jej poziom wykazuje znaczną zmienność w zależności od organizmu, etapu rozwoju, a nawet między poszczególnymi komórkami (Dominianni i wsp., 2012; Meyer i wsp., 2012; Tegowski i wsp., 2022). Analizy transkryptomiczne zwierzęcego materiału wskazują, że mRNA ponad 80% genów zawiera m6A, przy czym średnio jedna cząsteczka mRNA posiada 10 miejsc metylacji (Liu i wsp., 2022). Wcześniejsze badania na *A. thaliana* wykazały, że m6A stanowi 1-1,5% całkowitej liczby adenozyń w poliadenylowanych transkryptach (Zhong i wsp., 2008). Zastosowanie techniki MeRIP-Seq pozwoliło na identyfikację ponad 15 000 miejsc m6A w około 4000 transkryptach. Średnia liczba miejsc modyfikacji przypadających na jeden transkrypt wynosiła 2, jednak w niektórych mRNA zaobserwowano znacznie wyższą ich liczbę (Wong i wsp., 2023).

1.7 BIAŁKA REGULUJĄCE METABOLIZM I FUNKCJĘ M6A

Genom *A. thaliana* zawiera 29 genów kodujących 55 białek odpowiedzialnych za regulację modyfikacji m6A (Nishat i wsp., 2022). Funkcjonalnie białka te dzielą się na trzy grupy: "writers", "erasers" i "readers". Kompleks metylotransferaz, określany jako "writers", identyfikuje konserwowaną sekwencję RRACH i katalizuje dodanie grupy metylowej do adeniny w tej sekwencji. Z kolei kompleks demetylaz, zwany "erasers", usuwa grupy metylowe z RNA w procesie utleniania, co zapewnia odwracalność modyfikacji (Martínez-Pérez i wsp., 2017). Na poziomie molekularnym m6A odgrywa kluczową rolę w regulacji interakcji RNA z RBP. Modyfikacja ta może zarówno przyciągać, jak i odpychać różne RBP. Białka rozpoznające i wiążące m6A, określane jako "readers", pełnią istotną funkcję w przekazywaniu sygnałów związanych z obecnością m6A. Wpływają one na los docelowego RNA, bezpośrednio regulując jego funkcje lub rekrutując białka efektorowe, które pośredniczą w procesach zależnych od m6A (Arguello i wsp., 2017)

1.8 KOMPLEKS METYLUJĄCY m6A

W proces metylacji m6A zaangażowany jest ewolucyjnie konserwowany, wieloskładnikowy kompleks „writer”. U *A. thaliana* podstawę kompleksu tworzą dwie N6-metylotransferazy mRNA – MTA (ortolog zwierzęcego METTL3) oraz MTB (ortolog zwierzęcego METTL14). Dodatkowo obecne są w nim białka pomocnicze VIRILIZER (VIR, ortolog VIRMA), HAKAI i FIP37 (z ang. FKBP12 INTERACTING PROTEIN 37KD, ortolog WTAP) (Bujnicki i wsp. 2002; Zhong i wsp. 2008; Shen i wsp. 2016; Litholdo i Bousquet-Antonelli, 2019). Roślinne białka kompleksu „writer”, podobnie jak ich zwierzęce odpowiedniki, zlokalizowane są przede wszystkim w nukleoplazmie (Ruzicka i wsp. 2017). Na podstawie badań przeprowadzonych na komórkach ssaczych zaproponowano podział kompleksu metylotransferaz na dwie podjednostki. Pierwsza, utworzona przez MTA i MTB, stanowi katalityczny rdzeń kompleksu "writer" i jest określana jako kompleks m6A-METTL (MAC). Druga, nazywana kompleksem powiązanim z m6A-METTL (MACOM), zawiera białka FIP37, VIR i HAKAI, które są niezbędne do pełnej aktywności katalitycznej MAC (Knuckles i wsp., 2018).

Wiedza dotycząca specyficznej funkcji poszczególnych białek wchodzących w skład kompleksu „writer” u roślin wciąż jest ograniczona. Dotychczas nie zidentyfikowano precyzyjnych mechanizmów, poprzez które białka pomocnicze kompleksu MACOM mogłyby regulować aktywność metylotransferaz. Mimo to badania wskazują, że każde z białek wchodzących w skład kompleksu „writer” jest wymagane do przeprowadzenia procesu metylacji m6A. Świadczy to o ich wzajemnej zależności oraz konieczności współdziałania w celu utrzymania funkcjonalności kompleksu metylotransferaz u *A. thaliana* (Shen i wsp. 2023)

Jak wspomniano wcześniej nie wszystkie motywy RRACH w mRNA oraz nie każdy transkrypt jest metylowany. Mechanizmy decydujące o selektywności metylacji zarówno na poziomie transkryptu, jak i konkretnych miejsc w jego obrębie, pozostają mało poznane. Ostatnie badania sugerują, że za procesy te mogą odpowiadać białka RBP, określane mianem rekruterów m6A. Przykładem są białka FCA oraz OsFAP1 odpowiedzialne za połączenie metylotransferaz do określonych mRNA odpowiednio podczas kwitnienia *A. thaliana* oraz w trakcie mejozy u ryżu (Xu i wsp. 2021; Cheng i wsp. 2022). U zwierząt w regulację m6A zaangażowane są również modyfikacje epigenetyczne histonów. Wykazano, że modyfikacja H3K36me3, która przez METTL14 kotranskrypcyjnie kieruje metylacją m6A u zwierząt (Huang i wsp. 2019). Podobny mechanizm zaobserwowano u *A. thaliana*, gdzie m6A może być regulowane przez H3K36me2 (Shim i wsp. 2020). Powyższe wyniki sugerują, że proces

metylacji m6A jest regulowany na wielu poziomach, których współdziałanie umożliwia tworzenie specyficznych wzorców metylacji w zależności od rodzaju transkryptu, warunków środowiskowych czy etapów rozwoju organizmu. Jednakże zależności pomiędzy tymi elementami są niejasne i wymagają dalszych badań.

1.9 ODWRACALNOŚĆ METYLACJI M6A - DEMETYLAZY

Kiedy po raz pierwszy zidentyfikowano m6A w RNA, uznano tę modyfikację za mało istotną, zakładając jej statyczny charakter. Przełom nastąpił dopiero w 2011 roku, kiedy Jia i współpracownicy odkryli białko FTO (z ang. fat mass and obesity-associated protein), pełniące rolę demetylasy RNA. Odkrycie to dostarczyło dowodów na odwracalność i dynamiczność m6A, zmieniając dotychczasowe spojrzenie na jej funkcję i znaczenie.

W przeciwieństwie do kompleksu „writer”, którego aktywność wymaga współpracy wielu białek, demetylasy usuwające m6A działają niezależnie. Do tej pory jedynymi zidentyfikowanymi demetylazami u zwierząt są białka FTO i ALKBH5 (z ang. alkB homolog 5) (Zheng i wsp. 2013). U *A. thaliana* nie wykryto ortologów FTO, jednakże obecnych jest 13 białek homologicznych do ALKBH, wykazujących różnorodną lokalizację komórkową (Mielecki i wsp., 2012; Duan i wsp., 2017). Spośród nich ALKBH9A/9B/9C/10A/10B zostały zidentyfikowane jako homologi ALKBH5 (Duan i wsp. 2017). Natomiast tylko ALKBH9B i ALKBH10B potwierdzono jako aktywne demetylasy zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* (Duan i wsp. 2017; Martinez-Perez i wsp. 2017). U mutantów *alkbh9b* i *alkbh10b* zaobserwowano hipermetylację transkryptów, głównie wzbogaconych odpowiednio w regionie CDS i 3'UTR (Duan i wsp. 2017; Tang i wsp. 2022). Obie demetylasy występują w różnych obszarach komórki. ALKBH9B jest obecna w cytoplazmie oraz w granulach stresowych w trakcie stresu cieplnego. Z kolei ALKBH10B charakteryzuje się lokalizacją jądrocytoplazmatyczną. Na tej podstawie przypuszcza się, że obie demetylasy działają niezależnie kierując swoją aktywność na różne rodzaje RNA w różnych przedziałach komórkowych (Song i wsp. 2024).

1.10 BIAŁKA ROZPOZNAJĄCE M6A

Regulacja funkcji zależnych od m6A opiera się na mechanizmie rozpoznawania tej modyfikacji przez specyficzne białka, określane mianem kompleksu „reader”. Dotychczas zidentyfikowane białka rozpoznające m6A podzielono na trzy grupy w zależności od sposobu wiązania tej modyfikacji. Pierwszą grupę stanowią białka wykorzystujące wysoce

konserwowaną domenę YT521-B (YTH), która bezpośrednio i specyficznje wiąże m6A (Wang i wsp. 2014). Druga obejmuje heterogeniczne jądrowe nukleoproteiny (z ang. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs), które rozpoznają m6A w jednoniciowych fragmentach RNA, powstających w wyniku przebudowy struktury drugorzędowej indukowanej przez metylację (Alarcon i wsp. 2015; Liu i wsp. 2017). Działanie trzeciej grupy białek polega na wiązaniu m6A przez białka RBP, takie jak IGF2BP2 (z ang. insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2), choć szczegóły tego procesu nie zostały jeszcze wyjaśnione (Huang i wsp. 2018).

Większość poznanych do tej pory białek rozpoznaje m6A za pośrednictwem domeny YTH, która jest wysoce konserwowana ewolucyjnie wśród eukariontów, w tym ludzi, drożdży i roślin (Song i wsp., 2021a). W komórkach ssaków zidentyfikowano pięć białek zawierających tę domenę: YTHDF1-3 oraz YTHDC1-2. Białka te wiążą m6A w różnych przedziałach komórkowych, YTHDF1-3 w cytoplazmie a YTHDC1-2 w jądrze komórkowym (Liao i wsp., 2018). Z kolei w genomach roślinnych liczba genów kodujących białka z domeną YTH jest znacznie większa. W *A. thaliana* zidentyfikowano 13 takich białek, u ryżu 12, a w pszenicy aż 39. Wykazano także, że ekspresja białek zawierających domenę YTH może podlegać istotnym zmianom w zależności od etapu rozwoju rośliny lub działania czynników środowiskowych. Sugeruje to złożony mechanizm regulacyjny, w którym poszczególne białka YTH mogą rozpoznawać specyficzne transkrypty, pełniąc różnorodne role w modulacji procesów komórkowych (Song i wsp., 2024).

Białka zawierające domenę YTH obecne w *A. thaliana* można podzielić na dwie podgrupy, bazując na ich homologii do białek ssaczy. Pierwsza podgrupa obejmuje 11 białek oznaczonych jako ECT1-11 (z ang. evolutionarily conserved C-terminal region), które posiadają ewolucyjnie zachowany region C-końcowy i należą do rodziny YTHDF (Arribas-Hernandez i wsp. 2018; Chuong i wsp. 2023). Druga podgrupa składa się z dwóch białek: ECT12 oraz CPSF30 (z ang. cleavage and polyadenylation specificity factor 30), zaliczanych do rodziny YTHDC (Scutenaire i wsp. 2018; Song i wsp. 2021a).

Strukturalną różnicą między obiema grupami jest lokalizacja domeny YTH w obrębie białek. W białkach ECT1-11 domena ta znajduje się w pobliżu C-końca, natomiast w ECT12 i CPSF30 zlokalizowana jest w regionie wewnętrznym (Li i wsp. 2014). Niezależnie od swojego położenia, ~150-aminokwasowa domena YTH wiąże m6A poprzez specyficzną kieszeń, w której reszty tryptofanu otaczają miejsce modyfikacji (Song i wsp., 2024). Dodatkowo sąsiednie regiony RRACH, bogate w uracyl, wchodzą w interakcję z inherentnie nieuporządkowanym regionem białek ECT. Taka konfiguracja umożliwia ECT regulowanie

wiązania białek do RNA w sąsiedztwie m6A, co jest kluczowe dla procesów translacji i metabolizmu RNA (Arribas-Hernandez i wsp. 2018).

Pierwszym białkiem rozpoznającym m6A, które scharakteryzowano u *A. thaliana*, było ECT2. W cytoplazmie ECT2 współpracuje z białkami ECT3 i ECT4, co zwiększa jego zdolność do wiązania m6A (Arribas-Hernandez i wsp. 2018; Wei i wsp. 2018). Oba białka współpracują ze sobą, wiążąc mRNA zawierające m6A i regulując ich stabilność w komórce, natomiast nie wpływają bezpośrednio na proces translacji tych transkryptów (Arribas-Hernandez i wsp. 2021; Song i wsp. 2023). Istnieją jednak sprzeczne doniesienia na temat funkcji i miejsca działania ECT2. Wei i współpracownicy (2018) sugerowali, że ECT2 jest obecne zarówno w jądrze, gdzie reguluje długość 3'UTR, jak i w cytoplazmie, gdzie odpowiada za stabilność mRNA. Z kolei najnowsze badania wskazują, że ECT2 jest ograniczone do cytoplazmy, gdzie pełni kluczową rolę w ochronie mRNA przed degradacją, przy niewielkim wpływie na alternatywną poliadenylację (Arribas-Hernandez i wsp. 2021). Innym białkiem rozpoznającym m6A u *A. thaliana* jest CPSF30-L, które funkcjonuje jako jądrowe białko wiążące m6A. CPSF30-L, poprzez mechanizm LLPS, tworzy nieobłonione struktury w jądrze, gdzie odgrywa kluczową rolę w regulacji alternatywnej poliadenylacji mRNA zawierających m6A (Song i wsp. 2021b). Różnorodność lokalizacji komórkowej i mechanizmów działania białek wiążących m6A odzwierciedla złożoność i precyzję regulacji przetwarzania oraz metabolizmu RNA, które są kluczowe dla odpowiedzi komórki na zmieniające się warunki środowiskowe i etapy rozwoju.

Poza *A. thaliana*, białka rozpoznające m6A zostały zidentyfikowane również w innych roślinach, takich jak pomidor, ryż czy jabłoń (Guo i wsp., 2022; Ao i wsp., 2023; Cai i wsp., 2023). Natomiast wciąż są odkrywane nowe białka zdolne do wiązania m6A, co wskazuje na dynamiczny rozwój badań w tym obszarze (Huang i wsp., 2018; Amara i wsp., 2023). Pomimo tych postępów, wiedza na temat pełnego spektrum białek wiążących m6A oraz mechanizmów, które umożliwiają ich specyficzne rozpoznawanie modyfikacji i wpływ na los mRNA, pozostaje niepełna.

1.11 WPLYW M6A NA METABOLIZM RNA

N6-metyloadenozyna reguluje różne etapy metabolizmu RNA. Poprzez takie procesy jak stabilizacja, lokalizacja i struktura RNA, m6A reguluje translację, splicing, degradację czy transport transkryptów z jądra komórkowego (Nguyen i Kang, 2024). Dotychczasowy stan wiedzy na temat funkcji m6A opiera się w głównej mierze na wynikach badań komórek zwierzęcych. Niemniej obecne dowody sugerują, że podobnie jak u zwierząt, m6A u roślin może odgrywać istotną rolę w regulacji stabilności RNA (Chuong i wsp. 2023).

N6-metyloadenozyna może modulować proces translacji mRNA, promując go lub spowalniając w zależności od lokalizacji modyfikacji w transkrypcie, co wykazano w badaniach na zwierzętach (Rodriguez i wsp. 2022). Ponadto, znaczącą rolę w regulacji translacji pełnią białka rozpoznające m6A. Na przykład białka YTHDF1 i YTHDF3 wspierają translację swoich docelowych mRNA, zwiększając efektywność tego procesu (Nguyen i Kang, 2024; Li i wsp. 2017, Shi i wsp. 2017). Do białek związanych ze wzrostem wydajności translacji należą również YTHDF1 i YTHDC2, z których to drugie pełni kluczową rolę w procesie spermatogenezy (Wang i wsp. 2015; Hsu i wsp. 2017).

Dotychczas opublikowano niewiele danych na temat roli m6A w regulacji translacji u roślin, jednak wyniki dostępnych badań dostarczają interesujących spostrzeżeń. Badania przeprowadzone z udziałem mutantu *mta A. thaliana*, charakteryzującego się obniżonym poziomem metylacji m6A, wykazały wyższą wydajność translacyjną mRNA zarówno w warunkach kontrolnych, jak i podczas stresu wywołanego niską temperaturą (Wang i wsp. 2023). Natomiast obecność m6A w regionie kodonu start mRNA koreluje z wyższym poziomem syntezy białka wskazując, że może pełnić rolę sygnału wzmacniającego translację (Luo i wsp. 2020).

Poziom mRNA prawdopodobnie poprzez wpływ na stabilizację jest również regulowany przez m6A. Wskazują na to wyniki badań, które wykazały, że wyłączenie kluczowych elementów maszynierii, takich jak ECT2, CPSF30 czy MTA, prowadziło do obniżenia ilości m6A a następnie do przyspieszonej degradacji mRNA w komórkach *A. thaliana* (Duan i wsp. 2017; Wei i wsp. 2018; Song i wsp. 2021b). Inne rezultaty uzyskano w badaniach z użyciem roślin z knockoutem metylotransferazy FIP37, który skutkowało obniżeniem poziomu m6A jego docelowych mRNA, kodowanych przez geny *WUS* i *STM* związanych z merystemem wierzchołkowym, co w tym przypadku prowadziło do zwiększeniem ich stabilności (Shen i wsp. 2016). Podobne tendencje wskazujące, że m6A negatywnie koreluje z stabilnością RNA wykazano u mutantu demetylasy *alkbh10b*. Gdzie u roślin pozbawionych demetylasy, odnotowano wzrost poziomu m6A na mRNA kodowanym przez geny *FT*, *SPL3* i *SPL9*, co prowadziło do przyspieszonej degradacji tych transkryptów (Hofmann i wsp. 2017).

Szczegóły molekularnych mechanizmów, dzięki którym m6A wpływa na stabilność mRNA, wciąż nie są w pełni poznane. Dotychczasowe badania pozwoliły na sformułowanie dwóch potencjalnych modeli działania m6A w tym procesie. W pierwszym modelu m6A bezpośrednio oddziałuje na transkrypty, rekrutując specyficzne białka, takie jak kompleks CCR4-NOT, który inicjuje deadenylację i tym samym destabilizację mRNA. Alternatywnie,

m⁶A może kierować transkrypty do PB, co prowadzi do ich degradacji (Du i wsp. 2016; Wang i wsp. 2014). Drugi model zakłada, że m⁶A wpływa na stabilność RNA poprzez modyfikację jego struktury, wynikającą ze zmian w wewnętrznym parowaniu zasad (Roost i wsp., 2015). Badania wykazały, że dwuniciowe fragmenty RNA zawierające m⁶A są mniej stabilne w porównaniu z ich niemetylowanymi odpowiednikami. Jednocześnie m⁶A może wzmacniać stabilność jednoniciowych fragmentów RNA (Roost i wsp., 2015; Kierzek i Kierzek, 2003). Przedstawione wyniki pokazują, że brak jednoznacznych dowodów na udział m⁶A w degradacji czy stabilizacji mRNA i zależności te wymagają dalszych badań. Wydaje, że te regulacje mogą dotyczyć różnych pojedynczych mRNA i nie mają jednoznacznego odzwierciedlenie na poziomie całkowitego transkryptomu. Nie mniej jednak epitranskryptomyczna modyfikacja m⁶A pozostaje jednym z najbardziej obiecujących obszarów badawczych w dziedzinie regulacji ekspresji genów.

1.12 FUNKCJA N⁶-METYLOADENOZYNY W ODPOWIEDZ NA STRES HIPOKSJI I POWSTAWANIE SGs

Mechanizmy molekularne z udziałem m⁶A odgrywają kluczową rolę w wielu etapach wzrostu i rozwoju roślin, a także w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. O znaczeniu tej modyfikacji świadczy fakt, że brak podstawowych białek maszynerii m⁶A, takich jak MTA, MTB czy FIP37, prowadzi do letalności na etapie zarodkowym. Aby ominąć letalny fenotyp wynikający z braku metylotransferaz i umożliwić badanie funkcji m⁶A, grupa prof. Ruperta Fray'a opracowała strategię z wykorzystaniem promotora ABI3, który aktywuje syntezę metylotransferaz podczas rozwoju embrionalnego, a następnie silnie redukuje ich ekspresję po ok. 2 tygodniach od wysiania (Bodi i wsp., 2012). Dzięki tej metodzie uzyskano mutantą *mta A. thaliana*, u którego było możliwe badanie roli m⁶A w późniejszych stadiach rozwoju. Brak tej modyfikacji w RNA powodował deformacje kwiatów oraz utratę dominacji wierzchołkowej (Bodi i wsp., 2012). Podobnie, zaburzenia ekspresji innych metylotransferaz prowadziły do nieprawidłowości w rozwoju korzeni, kwiatów, liści oraz merystemów wierzchołkowych pędów i korzeni (Ruzicka i wsp., 2017; Shen i wsp., 2016; Tzafrir i wsp., 2004; Zemlyanskaya i wsp., 2023). Również mutanty z wyłączonymi genami kodującymi białka rozpoznające m⁶A wykazywały zaburzenia fenotypowe, obejmujące opóźniony wzrost i nieprawidłowe powstawanie liści, korzeni, łodygi, a także zaburzenia filotaksji i podziałów komórkowych (Arribas-Hernandez i wsp. 2018, 2020, Scutenaire i wsp. 2018). Interesujące jest, że nadekspresja tych białek prowadziła do deformacji łuszczyń i obumierania nasion (Arribas-

Hernandez i wsp. 2020). Powyższe wyniki wskazują, że prawidłowe funkcjonowanie roślin wymaga precyzyjnego utrzymania odpowiedniego poziomu białek zaangażowanych w m6A oraz samej modyfikacji. Zaburzenia w ich ilości mogą prowadzić do poważnych defektów, co podkreśla znaczenie m6A w koordynacji kluczowych procesów rozwojowych roślin.

Metylacja m6A może być istotnym elementem strategii szybkiego dostosowania wzorca ekspresji genów w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Dotychczasowe fragmentaryczne badania sugerują, że zarówno metylotransferazy, jak i demetylasy m6A mogą odgrywać ważną rolę w reakcjach roślin na stres biotyczny i abiotyczny (Martinez-Perez i wsp. 2021; Hu i wsp. 2019). W warunkach stresu solnego u *A. thaliana* zaobserwowano wzrost poziomu metylacji transkryptów genów odpowiedzialnych za reakcję na stres, co prowadziło do zwiększenia ich stabilności (Anderson i wsp., 2018). Podobne zmiany odnotowano podczas stresu wywołanego niską temperaturą, zarówno w ekspresji metylotransferaz, jak i w ogólnym poziomie m6A. Mutant *mta* *A. thaliana* charakteryzował się wyraźnie zwiększoną wrażliwością na zimno, co podkreśla kluczową rolę m6A w adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych (Govindan i wsp., 2022).

Udział w odpowiedzi na stres wykazano również dla demetylaz. W tym przypadku mechanizm odpowiedzi zależy od typu stresu. Mutanty ALKBH10B wykazują niższą tolerancję na stres suszy a ich transkryptom jest mniej stabilny (Han i wsp., 2023). Natomiast wyciszenie funkcjonalne tej metylazy w stresie solnym stabilizuje niektóre mRNA związane z odpowiedzią na stres solny oraz metabolizmem kwasu abscysynowego (Shoib i wsp. 2021; Tang i wsp. 2021). Niestety brak danych dotyczących udziału m6A w odpowiedzi na stres hipoksji.

Ostatnie badania sugerują, że metylacja adenozyliny w pozycji 6, może odgrywać kluczową rolę w selektywnej sekwestracji mRNA do SGs u zwierząt. Postuluję się udział tej modyfikacji w indukcji LLPS bądź interakcji z białkami obecnymi w SGs (Kearly i wsp. 2024). Anders i współpracownicy (2018) w badaniach na komórkach ludzkich wykazali, że poziom m6A wzrasta w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Zwiększeniu uległa zarówno pula metylowanych mRNA jak i stopień metylacji w poszczególnych transkryptach. Wykazano, że 95% mRNA których poziom m6A wzrósł w odpowiedzi na stres było zlokalizowanych w SGs. Z kolei usunięcie miejsc metylacji w pojedynczym mRNA skutkowało zatrzymaniem jego akumulacji w granulach stresowych (Anders i wsp. 2018). Podobną zależność zaobserwowano w trakcie badań na linii komórkowej pozbawionej genu METTL3 odpowiedzialnego za metylację (Ries i wsp. 2023). Autorzy tej pracy wskazują, że zależna od długości mRNA akumulacja w SGs jest wynikiem wyłącznie metylacji m6A. Długie mRNA często zawierają

jeden lub więcej długich eksonów, które potencjalnie posiadają więcej miejsc metylacji. W komórkach ssaków pozbawionych m6A, długie mRNA nie lokalizowały w granulach stresowych. Pomimo, że większość prac prowadzonych na komórkach zwierząt pokazuje pozytywny udział m6A w rekrutacji mRNA do SG, ostatnio Khong i wsp. (2022) sugeruje raczej jej umiarkowany wpływ w tym procesie. Wykazano, że transkrypty niezależnie od m6A i przyłączenia białek YTHDF są sekwestrowane w SG.

Do tej pory opublikowano znacznie mniej badań dotyczących roli m6A w SGs u roślin (Scutenaire i wsp. 2018, Fan i wsp., 2023). Jedną z nich potwierdza mechanizmy z udziałem m6A obserwowane u zwierząt. Wykazano, że u *A. thaliana* metylacja m6A aktywowanego termicznie retrotranspozonu Onsen prowadziła do jego akumulacji w SGs, co ograniczało jego mobilność (Fan i wsp., 2023). Natomiast nie badano innych typów transkryptów. O potencjalnej roli modyfikacji m6A w lokalizacji mRNA w SGs może również świadczyć fakt, że białka zawierające domenę YTH zostały wykryte w tych strukturach u *A.thaliana* w trakcie stresu cieplnego (Scutenaire i wsp. 2018; Kosmacz i wsp. 2019). Jednak nie wiemy jaką rolę w powstawaniu SG mają te białka oraz czy wpływają na transkryptom tych struktur. Ostatnio wykazano także wpływ m6A na kumulację RNA w PB u roślin (Liu i wsp., 2024). Zatem pozostaje do wyjaśnienia funkcje tej modyfikacji w sekwenstracji mRNA w SG u roślin. Co odpowie na pytanie, czy mechanizm ten jest uniwersalny dla eukariota?

CEL PRACY

Granule stresowe stanowią ważny element odpowiedzi organizmu na stres abiotyczny. Związane są z regulacją ekspresji genu w tym głównie z ilością i dostępnością mRNA dla procesu translacji. Pomimo trwających badań, ciągle nie wiadomo jak powstają te struktury u roślin. Czy ich skład jest ściśle regulowany czy jest tylko wypadkową zagęszczenia pewnych molekuł w cytoplazmie. Nie znamy także roli nowo poznanych mechanizmów regulacji ekspresji genów takich jak np.: regulacje epitranskryptomiczne na montaż tych struktur w cytoplazmie. Dodatkowo dotychczasowe badania głównie są prowadzone na roślinie modelowej *A. thaliana*. Zatem nieznanym jest stopień uniwersalności tego zjawiska oraz w jakim stopniu dotyczy roślin uprawnych.

Dlatego też badając naturę i funkcję ciał stresowych u roślin podczas niedotlenienia celem pracy było:

- identyfikacja i badania etapów powstawania SG oraz poznanie struktury i dystrybucji molekuł na ich terenie,
- zbadanie zmian transkryptomu łubinu w odpowiedzi na stres hipoksji oraz podczas powrotu do warunków fizjologicznych,
- poznanie zmian ilości m⁶A na poziomie epitranskryptomu łubinu,
- określenie roli m⁶A w powstawaniu SG.

Badania prowadzono głównie na *Lupinus angustifolius* (L.) Ze względu na swoje liczne właściwości odżywcze, m.in. wysoką zawartość białka i błonnika pokarmowego przy jednocześnie niskim indeksie glikemicznym, jawi się jako potencjalny element zdrowej żywności dla ludzi (Foley i wsp. 2011). Ekspertcy prognozują, że w ciągu najbliższych lat może stać się głównym komponentem pasz oraz zielonych nawozów. Jego dużą zaletą jest przynależność do roślin dnia długiego, co daje mu przewagę adaptacyjną w warunkach klimatycznych Polski w porównaniu np. do soi (Stawiński, 2016). W ostatnich latach znacznie wzrosła dostępność zasobów genomowych dla *L. angustifolius*, co czyni tę roślinę obiecującym modelem do badań transkryptomicznych (Singh i wsp., 2020). Dzięki dużym rozmiarom komórek i struktur komórkowych, łubin wąskolistny stanowi doskonały model do badań komórkowo-molekularnych.

Ponieważ jak dotąd nie ma mutantów *L. angustifolius*, dlatego w badaniach funkcyjnych wykorzystano rośliny typu wt i mutanty *A. thaliana*. Dodatkowo w celu pogłębionej analizy roli m⁶A w biologii granul stresowych wygenerowano mieszańce umożliwiające badanie tego zjawiska.

MATERIAŁY

3.1 MATERIAŁ BADAWCZY

W trakcie eksperymentów wykorzystano następujący materiał roślinny:

- *Lupinus angustifolius* (L.) odmiany Sonet (Torseed, Polska)
- *Arabidopsis thaliana* (L.) roślina transgeniczna Pro35S:GFP-Rbp47b – nasiona otrzymano od Emilio Gutierrez-Beltran z University of Seville
- *Arabidopsis thaliana* (L.) roślina transgeniczna ECT2-GFP – nasiona otrzymano od Cecile Bousquet-Antonelli z Université de Perpignan Via Domitia
- *Arabidopsis thaliana* (L.) mutant mtaABI3:MTA – nasiona otrzymano od Rupert George Fray z University of Nottingham
- *Arabidopsis thaliana* (L.) mieszaniec ECT2-GFP x mtaABI3:MTA
- *Arabidopsis thaliana* (L.) mieszaniec Pro35S:GFP-Rbp47b x mtaABI3:MTA

3.2 OLIGONUKLEOTYDY

Oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed (Polska).

Hybrydyzacja *in situ*

Nazwa	Sekwencja (5' – 3')	Znakowanie
Poli(A) RNA	T(T) ₂₉	Cy3, TET, Cy5
<i>ADH1</i>	CACCTGGTTTCAGATGAGTCACACCCTCTCCTA	Cy3
<i>HUP7</i>	TTGGCTAGTCGAGCTGTGTTGCCATGTGATACAA	TET
<i>5' HUP7</i>	ACGAATTCTTGTGGCTGCCAGCATTGTTCCA	Cy3
<i>PCO1</i>	ATCAGCTAAAGTCCTCTCAGTACCCATTCAA	Cy3
<i>WIN1</i>	ACTGTGATGGTTGCTTGTGTTTGTGTTATCAGA	Cy3
<i>RPB1</i>	CATAATCATCTTTTGTAAGTGAGGCAATGTCCGGTCTAT	Cy3
<i>5' RPB1</i>	TGCTCAATTTGCACCACAGACATCTGTCTAATTTC	TET
<i>L37</i>	TGATAATGAAGCCACTAAATATCATAGGAA	Cy3
<i>L44</i>	GTGCAGTGTATGCTTCTTGCATTCCTTGTTTC	Cy3
<i>18S rRNA</i>	TTATCTAATAAATGCATCCTTCCAGGAAGTCG	TET
<i>26S rRNA</i>	TCCCGACAGGACGCTCTCACTCGAACCCTTC	TET

RT-qPCR

Nazwa	Sekwencja (5' – 3')	
UBC5	F: GAAATCGAGCGATGAAGAGC	R: CCCCTACCAGCAGCAATAAA
ADH1-1	F: ATGAAGCTGGAGGGATTGTG	R: AGGTTCCGACAAAATGATGC
ADH1-2	F: CATGAAGCTGGAGGGATTGT	R: CGAGGTTCCGACAAAATGAT
HUP7-1	F: CACGTCATTCCAAGAGCGAG	R: TCGTACATCAAATGCGCTGG
HUP7-2	F: CCGCCGCTGAAATCTTGTA	R: CCCCAAATGGCAAGGAAGAG
RPB1-1	F: TTGGATTGAAACCCAGAAGC	R: TTCAGCCTCAAACACACTGC
RPB1-2	F: TACCCCGAGACTGTGACTCC	R: ATGACGCTCCACCTTGTACC
L37-1	F: AGGGTTCTGCATCTGCATCT	R: ACGACTCTTCTGGAGGTGGA
L37-2	F: ATGGGGAAGGGAACAGGTA	R: ACGAATTGCCTTCACACTCC
L44-1	F: GCAAACAGTCCGGTTATGGT	R: CCCTTCTTGTCACCACCAAT
L44-2	F: TGCAAGAACAAGGAATGCA	R: GCACTGCAACCTCAAGACAA
WIN1-1	F: CGTGCAGGGTCTAGTTCTGA	R: TGCTCCTCATCCAACCCATT
WIN1-2	F: GATGAGTGAAGAAACGCCA	R: TCAGAACTAGACCCTGCACG
PCO1-1	F: CGCTGACTCTTCCACCTTTG	R: GAGGACCAAGCACGTCTAGA
PCO1-2	F: AACCGGTGGCGTACTAAGAA	R: ATACGGCATGTCAGGTGTCA
GLuc	F: CGACATTCCTGAGATTCCTGG	R: TTGAGCAGGTCAGAACACTG
CLuc	F: GCTTCAACATCACCGTCATTG	R: CACAGAGGCCAGAGATCATTC

PCR - genotypowanie

Nazwa	Sekwencja (5' – 3')	Cel
074069LP	TCGAAACGATTTGGAAAAATG	Lewy/przedni starter do endogennego <i>MTA</i>
074069RP	AGGATTGGTTTGCATGTCAAG	Prawy/wsteczny starter do endogennego <i>MTA</i>
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Lewy/przedni starter do T-DNA
MTAGFPfwd	ACGGTTTGATTTTCCTCTGGG	Lewy/przedni starter do transgenu ABI3:MTA
GFPprev	GAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG	Prawy/wsteczny starter do transgenu ABI3:MTA

3.3 PRZECIWCIAŁA

Przeciwciała pierwotne

Rozpoznawany antygen	Klonalność	Pochodzenie	Firma	Znakowanie
PAB2	poliklonalne	królicze	Dzięki uprzejmości Cecile Bousquet-Antonelli	-
m6A	monoklonalne	królicze	New England Biolabs, USA	-
m6A	poliklonalne	królicze	Synaptic Systems, Niemcy	-
m6A	poliklonalne	królicze	Merck, Niemcy	-
DCP5	poliklonalne	królicze	Dzięki uprzejmości Shu Hsing Wu	-

Przeciwciała wtórne

królicze IgG	poliklonalne	kozie	Thermo Fisher Scientific, USA	Alexa fluor 488
królicze IgG	poliklonalne	kozie	BBInternational	20nm ziarna złota

3.4 ODCZYNNIKI

albumina wołowa (BSA)	Sigma-Aldrich
agar	Duchefa Biochemie
agaroza	Merck
alkohol etylowy 96%	POCH S.A.
AMPure XP Beads	Beckman Coulter
Biobond	Pelco
BMM - mieszanina metakrylanu	Merck
butylu i metakrylanu metylu	
celulaza Onozuka R10	Serva
chlerek sodu	Sigma-Aldrich
chloroform	POCH S.A.

cykloheksymid	Merck
cytrynian ołowiu	Roth
cytrynian trójsodowy	POCH S.A
czterotlenek osmu	Sigma-Aldrich
DEPC - Pirowęglan dietylu	Sigma-Aldrich
ditiotetriol (DTT)	Thermo Scientific
Dynabeads protein G	Invitrogen
EDTA	Eurx
formamid	Sigma-Aldrich
GlycoBlue Coprecipitant	Invitrogen
Hoechst 34580	Invitrogen
Protease Inhibitor Cocktail	Merck
inhibitor Rybonukleaz	Eurx
isopropanol	Thermo Scientific
kwasy cytrynianowy	POCH S.A
leptomycyna B	Sigma-Aldrich
Loading Buffer BLUE 6X	Eurx
LR gold	Sigma-Aldrich
NP.-40	AppliChem
octan magnezu	Sigma-Aldrich
octan potasu	Serva
octan sodu	Sigma-Aldrich
octan uranylu	Agar Scientific
paraformaldehyd	Thermo Scientific
PBS – buforowana fosforanem	Sigma-Aldrich
sól fizjologiczna	
pektynaza	Sigma-Aldrich
podchloryn sodu	POCH S.A
Pożywka Murashige & Skoog	Duchefa Biochemie

ProLong Gold	Invitrogen
Proteinaza K	Eurx
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Scientific
RNA Loading Buffer 2X	Eurx
Rnaza A	Thermo Scientific
Sacharoza	POCH S.A
SDS - dodecylsulfate sodu	Sigma-Aldrich
SimplySafe	Eurx
TAE x 50	Eurx
Tris	Sigma-Aldrich
TRIZol	Invitrogen
Witaminy Murashige & Skoog x1000	Duchefa Biochemie

Zestawy odczynników

Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent)

EpiMark N6-Methyladenosine Enrichment Kit (New England Biolabs)

LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)

NEBNext Magnesium RNA Fragmentation Module (New England Biolabs)

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) (New England Biolabs)

NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs)

NEBNext Ultra II Directional RNA Second Strand Synthesis Module (New England Biolabs)

PolyATtract mRNA Isolation Systems (Promega)

Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

RQ1 RNase-Free DNase (Promega)

Spurr Low Viscosity Embedding Kit (Sigma-Aldrich)

Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)

3.5 BUFORY I MIESZANINY

Woda wolna od RNaz

W celu przygotowania wody wolnej od RNaz, do 1 litra wody destylowanej dodano 1 ml pirokarbonianu dietylu (DEPC) (Sigma) i inkubowano roztwór przez noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji roztwór poddano dwukrotnemu autoklawowaniu w temperaturze 121°C przez 30 minut przy ciśnieniu 1 atm.

Pożywka Murashige & Skoog (MS)

Pożywkę MS przygotowano na wodzie destylowanej. W jej skład wchodziły:

- 2,15 g/l żywka Murashige & Skoog
- 103.1 mg/l Witaminy Murashige & Skoog x1000 stężone
- 10 g/l Sacharoza

Wszystkie składniki dokładnie mieszano, po czym ustalano pH roztworu na wartość 5,8. Następnie dodawano 7,5 g/l agarozę i podgrzewano mieszaninę do momentu całkowitego rozpuszczenia agaru. Pożywkę sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut pod ciśnieniem 1 atm. Po ostygnięciu, pod komorą laminarną, żywkę wlewano na szalki Petriego, pozostawiając do zestalenia.

Utrwalacz

Skład mieszaniny utrwalającej obejmował:

- ¼ docelowej objętości 16% formaldehydu
- ½ docelowej objętości 2 x PBS
- ¼ docelowej objętości wody destylowanej

Bufor do izolacji DNA (EB)

W skład buforu EB wchodziły:

- 200mM Tris-HCl
- 250mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 0,5% SDS

Bufor dokładnie mieszano i ustalano pH 8.

Bufor lizujący (BL) do izolacji SGs

Bufor BL przygotowywano na wodzie wolnej od RNaz (DEPC) i przechowywano w RT. W jego skład wchodziły:

- 50 mM Tris – HCl (pH 7.4)
- 100 mM KOAc
- 2 mM MgOAc
- 0,5 mM DTT
- 0,5% NP40

Bezpośrednio przed użyciem buforu dodawano do niego: inhibitor proteaz (1ml/100ml buforu) inhibitor RNaz (40 U/μl) oraz DTT (0,5 mM).

Bufor cytrynianowy 10x

Bufor cytrynianowy 10^x o objętości 500 ml przygotowywano poprzez rozpuszczenie 4,2 g kwasu cytrynowego w 200 ml wody destylowanej (Bufor A) oraz 8,5 g cytrynianu trójsodowego w 300 ml wody destylowanej (Bufor B). Oba roztwory mieszano, po czym ustalano pH mieszaniny do wartości 4,8.

Mieszanina enzymów trawiących

W skład mieszaniny enzymów trawiących wchodziły:

- 4% celulaza Onozuka R10
- 35 U/ml pektynaza
- 0.01M bufor cytrynianowy

Żel agarozowy

Żele agarozowe wykorzystywano do rozdzielania produktów reakcji PCR (2%) oraz analizy RNA (1,5%). W tym celu odważano odpowiednio 1,5 g lub 2 g agarozy, dodawano 98 ml wody wolnej od RNaz oraz 2 ml buforu 50^x TAE. Mieszaninę podgrzewano kilkakrotnie, aż do całkowitego rozpuszczenia agarozy. Po przestudzeniu dodawano 5 μl barwnika SimplySafe i mieszano do uzyskania jednorodnego roztworu. Następnie mieszaninę wylewano na saneczki z uprzednio umieszczonym grzebieniem, pozostawiając do całkowitego zestalenia.

Bufory do immunoprecypitacji m6A

Roztwór 10% NP-40 przygotowany w wodzie wolnej o RNaz (DEPC). Następnie przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego 0,22 μM (Genoplast) i przechowywano w RT.

Bufor o niskiej zawartości soli (LSB):

- 0.05M NaCl
- 0.01M Tris-HCl, pH 7.5.

Bufor o wysokiej zawartości soli (HSB):

- 0.5M NaCl
- 0.01M Tris-HCl, pH 7.5

Bufor do immunoprecypitacji (IP)

- 0.15M NaCl
- 0.01M Tris-HCl, pH 7.5

Następnie bufor autoklawowano w temperaturze 121°C przez 30 minut pod ciśnieniem 1 atm i przechowywano w RT.

METODY

4.1 HODOWLA ROŚLIN

4.1.1 *L. angustifolius*

Nasiona *L. angustifolius* poddawano sterylizacji w 70% alkoholu etylowym przez 5 minut. Następnie pięciokrotnie przepłukiwano wodą destylowaną, aby usunąć pozostałości alkoholu, po czym inkubowano przez 30 minut w wodzie destylowanej. Nawodnione nasiona umieszczano na bibule nasączonej wodą i hodowano w ciemności w temperaturze 21°C. Po trzech dniach część siewek poddano stresowi hipoksji, a z pozostałych odcinano korzenie, które posłużyły jako próba kontrolna. Korzenie zamrażano w ciekłym azocie lub utrwalano w 4% paraformaldehydzie do dalszych analiz.

Stres hipoksji indukowano poprzez zalanie siewek wodą kranową przy zachowaniu niskiej saturacji tlenem (stężenie tlenu: 8,7 mg/l), utrzymując poziom wody około 4 cm nad roślinami. Siewki hodowano w tych warunkach przez okres 1, 6, 9 i 15 godzin. Po zakończeniu każdego okresu korzenie siewek odcinano, a następnie zamrażano lub utrwalano. W celu ponownego natlenienia rośliny po 15 godzinach hipoksji inkubowano na bibule nasączonej wodą, w warunkach stosowanych do kiełkowania nasion, a następnie zbierano korzenie.

4.1.2 Kultura *in vitro* *A. thaliana*

Całą procedurę przeprowadzono w warunkach sterylnych pod komorą laminarną. Nasiona *A. thaliana* sterylizowano w 75% alkoholu etylowym przez 2 minuty, a następnie 8 minut w 5% podchlorynie sodu. Po zakończeniu sterylizacji nasiona przepłukiwano siedmiokrotnie sterylną wodą destylowaną. Przy każdym płukaniu wodę dodawano, a po chwili odciągano. Dodatkowo, piąte i siódme płukanie wydłużono do 10 minut. Wysterylizowane nasiona wysiewano na szalkach Petriego zawierających sterylną pożywkę MS o pH 5,8.

Rośliny hodowano przez 17 dni w komorze fitotronowej w warunkach kontrolowanych: temperatura 21°C, fotoperiod 16/8 godzin (dzień/noc) oraz natężenie światła 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Po zakończeniu tego okresu część korzeni poddawano stresowi niedotlenienia, a pozostałe rośliny pozostawiono do dalszej hodowli.

W celu indukcji niedotlenienia szalki z siewkami umieszczano w pojemniku wypełnionym sterylną wodą o niskim natężeniu tlenu (8,7 mg/l). Poziom wody utrzymywano około 5 cm nad roślinami. Hodowlę kontynuowano w tych samych warunkach hodowlanych, ale przy niskim

natężeniu światła. Następnie korzenie grupy kontrolnej oraz poddanej stresowi niedotlenienia odcinano i utrwalano w 4% paraformaldehydzie

4.2 WSTĘPNE PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU

Korzenie przeznaczone do analiz transkryptomycznych, bezpośrednio po zebraniu zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C . Korzenie przeznaczone do analiz mikroskopowych po zebraniu utrwalano przez noc (*L. angustifolius*) lub godzinę (*A. thaliana*) w 4°C w mieszaninie utrwalającej. Po utrwaleniu, korzenie trzykrotnie odpłukiwano w PBS przez 10 minut.

4.3 KRZYŻOWANIE MUTANTÓW *A. THALIANA*

Krzyżowanie

Rośliny transgeniczne ECT2-GFP i Pro35S:GFP-Rbp47b krzyżowano z mutantem *mta*, nanosząc pyłek jednej z roślin na znamię słupka drugiej. Nasiona z oznaczonych łuszczyń zbierano i wysiewano w doniczkach na nasączonych wodą krążkach torfowych. Z uzyskanego pokolenia F2, będącego heterozygotycznym pod względem mutacji *mta*, zbierano nasiona po samozapyleniu. Nasiona te poddano sterylizacji i hodowano w kulturze *in vitro* zgodnie z wcześniejszym opisem. Po 8 dniach od wysiewu selekcjonowano siewki na podstawie fluorescencji GFP w korzeniach, obserwowanej pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wyselekcjonowane siewki przenoszono do hodowli doniczkowej na krążkach torfowych. Po tygodniu z każdej rośliny pobierano liść, z którego izolowano DNA.

Izolacja DNA

Do 1,5 ml probówki typu Eppendorf dodawano 200 μl buforu EB, po czym umieszczano w niej pojedynczy liść, który homogenizowano przez ucieranie. Następnie próby wirowano przez 3 minuty przy $13\ 000 \times g$ w RT, a supernatant przenoszono do nowej probówki. Do uzyskanego supernatantu dodawano 250 μl izopropanolu i inkubowano w -20°C przez 20 minut. Po inkubacji próbki wirowano przez 7 minut przy $13\ 000 \times g$ w temperaturze pokojowej, a następnie dwukrotnie przemywano schłodzonym 70% alkoholem etylowym. Po każdym płukaniu próby wirowano przez 5 minut przy $13\ 000 \times g$ w temperaturze pokojowej, a supernatant odrzucano. Osad suszono w otwartej probówce w temperaturze pokojowej przez około 30 minut, po czym zawieszano w 20 μl sterylnej wody.

Reakcja PCR

Analizę homozygotyczności roślin prowadzono metodą PCR. Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystano odczynnik Taq PCR Master Mix Kit. Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował: 12,5 µl polimerazy Taq DNA, 1 µl pary wybranych starterów stężeniu 0,2 µM, 2 µl DNA oraz 9,5 µl sterylnej wody. Reakcję PCR prowadzono z wykorzystaniem termocyklera C1000 (Bio-Rad) zgodnie z poniższym profilem termicznym:

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94°C	3 minuty	1
Denaturacja	94°C	1 minuta	
Przyłączanie starterów	55°C	1 minuta	40
Wydłużanie	72°C	1 minuta	
Wydłużanie końcowe	72°C	10 minut	1

Uzyskane produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie.

4.4 INHIBICJA TRANSLACJI I TRANSPORTU JĄDROWO-CYTOPLAZMATYCZNEGO

Siewki łubinu wąskolistnego hodowano zgodnie z wcześniej opisanym protokołem. Przed wprowadzeniem stresu niedotlenienia przeprowadzono pomiar długości korzeni oraz masy siewek. Następnie poddano je 14-godzinnej hipoksji. Po zakończeniu tego etapu część korzeni zebrano i utrwalono, stanowiąc kontrolę pozytywną do oceny wywołania stresu i obecności granul stresowych. Pozostałe korzenie podzielono na dwie grupy: kontrolną oraz eksperymentalną. Do grupy eksperymentalnej dodano jeden z następujących inhibitorów:

- 4 mg/ml cykloheksymid (inhibitor elongacji translacji)
- 10 ng/ml leptomycyna B (inhibitor transportu jądrowo-cytoplazmatyczny)

Obie grupy poddano dodatkowej godzinnej hipoksji, przeprowadzając inkubację w pompie próżniowej. Po zakończeniu tego okresu ponownie zmierzono długość korzeni oraz masę siewek, a następnie część korzeni utrwalono. Pozostałe korzenie poddano procesowi ponownego natlenienia, umieszczając je na bibule nasączonej roztworem inhibitora przez okresy 6, 10 i 20 godzin. Po zakończeniu każdego etapu ponownie oceniano długość i masę korzeni oraz utrwalano je w celu przygotowania preparatów mikroskopowych do dalszych analiz.

4.5 IZOLACJA GRANUL STRESOWYCH

Wszelkie wykorzystane w trakcie izolacji materiały i odczynniki były wolne od RNaz. Zamrożone poddane 15 godzinnemu niedotlenieniu, korzenie *L. angustifolius* ucierano w schłodzonym ciekłym azotem móździerzu. Odważano 2 g zamrożonego, utartego materiału i zawieszano go w 5 ml buforu lizującego (BL). Uzyskaną mieszaninę filtrowano przez dwie warstwy Miracloth (Merck), po czym wirowano przy $850 \times g$ przez 5 minut w temperaturze $4^{\circ}C$. Supernatant przenoszono do nowej probówki typu falcon, dodawano 5 ml BL i ponownie wirowano przy $4000 \times g$ przez 10 minut w $4^{\circ}C$. Po odrzuceniu supernatantu, osad zawieszano w 2 ml BL i wirowano przy $18000 \times g$ przez 10 minut w $4^{\circ}C$. Następnie supernatant usuwano, a osad zawieszano w 2 ml BL, worteksowano i ponownie wirowano przy $18000 \times g$ przez 10 minut w $4^{\circ}C$. Po odrzuceniu supernatantu osad zawieszano w 1 ml BL i wirowano przy $850 \times g$ przez 10 minut w $4^{\circ}C$. Supernatant zawierający frakcję SGs przenoszono do nowego, schłodzonego eppendorfa.

4.6 ANALIZY MIKROSKOPOWE

4.6.1 Przygotowanie materiału do obserwacji mikroskopowych

Preparaty z protoplastów z korzeni *L. angustifolius*

Utrwalone korzenie płukano dwukrotnie przez 4 minuty w 0,01 M buforze cytrynianowym pH 4,8. Nadmiar tkanki korzeniowej odcinano, a następnie korzenie inkubowano w mieszaninie enzymów trawiących w celu usunięcia ściany komórkowej. Proces trawienia prowadzono przez 2 godziny w temperaturze $37^{\circ}C$ przy ciągłym mieszaniu z prędkością 60 RPM. Po zakończeniu trawienia korzenie delikatnie płukano: dwukrotnie po 3 minuty w 0,01 M buforze cytrynianowym oraz dwukrotnie po 5 minut w PBS. Następnie wykonywano rozmaz korzeni na adhezyjnych szkiełkach mikroskopowych pokrytych Biobondem. Szkiełka z próbkami zamrażano w temperaturze $-80^{\circ}C$ na 20 minut, po czym suszono je w termostacie w $37^{\circ}C$.

Preparaty ze skrawków półcienkich

Utrwalone korzenie *A. thaliana* i *L. angustifolius* odwadniano w rosnących stężeniach wodnych roztworów alkoholu etylowego z dodatkiem 10 mM DTT. Korzenie inkubowano kolejno w roztworach o stężeniach 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% i 96%, każdorazowo przez 10 minut. Następnie przenoszono je do 99,8% alkoholu etylowego, gdzie

inkubowano dwukrotnie po 30 minut. Po odwodnieniu korzenie przesycało się roztworem żywicy BMM w 99,8% alkoholu etylowym z dodatkiem 10 mM DTT, stopniowo zwiększając proporcje żywicy do alkoholu: 1:3, 1:1 oraz 3:1. Próby w każdej z mieszanin inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnie korzenie inkubowano w 100% żywicy BMM przez 24 godziny w 4°C. Aby usunąć pozostałości powietrza z próbek i żywicy, korzenie przenoszono do świeżej żywicy BMM i umieszczano w pompie próżniowej (0,1 MPa) na 2 godziny. Po zakończeniu przesycaania próbki zamykano w kapsułkach, które wypełniano 100% żywicą BMM. Tak przygotowany materiał polimeryzowano przez 5 dni w świetle UV w temperaturze -20°C. Następnie korzenie krojono na półcienkie skrawki o grubości 1,5 µm przy użyciu ultramikrotomu Leica UCT. Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych Biobondem i suszono przez 2 godziny w temperaturze 37°C.

Przygotowanie skrawków ultracienkich

Korzenie przeznaczone do standardowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej utrwalano w 3% glutaraldehydzie w PBS przez noc w temperaturze 4°C, po czym trzykrotnie płukano je w PBS przez 10 minut. Następnie utrwalano je dodatkowo w 1% czterotlenku osmu (OsO₄) w PBS przez 1 godzinę w 4°C i ponownie płukano w PBS. Proces odwadniania przeprowadzano w roztworach alkoholu etylowego o wzrastających stężeniach (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%), inkubując próbki w każdym roztworze przez 15 minut. Po tym etapie korzenie umieszczano w 99,8% alkoholu etylowym na dwie inkubacje po 30 minut każda. Odwodnione korzenie przesycało się stopniowo roztworem żywicy Spurr w 99,8% alkoholu etylowym w proporcjach: 1:3 (żywica:alkohol) przez 1 godzinę w 4°C, następnie 1:1 przez 1 godzinę w 4°C, a kolejno 3:1 przez noc w 4°C. Następnie próbki inkubowano w 100% żywicy Spurr przez 8 godzin, po czym umieszczano je w silikonowych formach, zalewano żywicą i polimeryzowano w cieplarni w temperaturze 65°C przez 24 godziny. Gotowy materiał krojono na ultracienkie skrawki o grubości 50–80 nm za pomocą ultramikrotomu Leica UCT i przenoszono na miedziane siatki. Skrawki przeznaczone do analizy ultrastruktury kontrastowano w 2,5% roztworze octanu uranylu przez 20 minut, a następnie w 2,5% roztworze cytrynianu ołowiu przez 20 minut. Po każdym etapie kontrastowania siatki płukano pięciokrotnie w wodzie destylowanej (po 3 minuty), a następnie suszono.

Korzenie przeznaczone do lokalizacji immunozłotej utrwalano w roztworze 4% paraformaldehydu i 0,25% glutaraldehydu w PBS przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Utrwalacz odpłukiwano trzykrotnie po 10 minut w PBS, a następnie próbki odwadniano i

przesączało żywicą LR Gold zgodnie z opisanym powyżej schematem. Przesycone żywicą korzenie umieszczano w żelatynowych kapsułkach wypełnionych 100% żywicą LR Gold i polimeryzowano w temperaturze 4°C przez minimum 72 godziny. Gotowy materiał krojono na ultracienkie skrawki o grubości 50–80 nm przy użyciu ultramikrotomu Leica UCT i przenoszono na miedziane siatki.

4.6.2 Hybrydyzacja *in situ* i immunolokalizacja

Przygotowanie protoplastów

Przed rozpoczęciem lokalizacji badanych molekuł, protoplasty poddawano permeabilizacji błony komórkowej. W tym celu protoplasty inkubowano w 0,1% roztworze Triton X-100 w PBS przez 10 minut w temperaturze pokojowej (RT), po czym trzykrotnie płukano w PBS (3 × 3 min).

Przygotowanie skrawków półcienkich

Aby usunąć żywicę BMM ze skrawków, preparaty inkubowano w 100% acetonie przez 15 minut, następnie w 50% acetonie przez minutę. Skrawki płukano dwukrotnie po 5 minut w wodzie destylowanej i kolejne 2 x 5 minut w PBS.

Hybrydyzacja *in situ*

Hybrydyzację *in situ* rozpoczęto od tzw. reakcji prehybrydyzacji w celu przystosowania materiału do warunków hybrydyzacji i zwiększenia jej efektywności. Na preparaty nałożono mieszaninę hybrydyzacyjną o składzie:

Składnik	Objętość
bufor hybrydyzacyjny	50%
formamid	30%
H ₂ O bez RNaz	20%

Inkubację prowadzono w wilgotnej komorze wypełnionej 30% formamidem przez 30 minut w temperaturze 26°C na wytrząsarce (60 RPM). Następnie na preparaty nakładano sondę w następujących rozcieńczeniach:

- Sonda komplementarna do poli(A) RNA 1:250 w mieszaninie hybrydyzacyjnej – mikroskopia konfokalna
- Sonda komplementarna do poli(A) RNA 1:600 w mieszaninie hybrydyzacyjnej – mikroskopia wysokorozdzielcza

- Sonda komplementarna do mRNA 1:200 w mieszaninie hybrydyzacyjnej – mikroskopia konfokalna

Przy jednoczesnej lokalizacji poli(A) RNA i mRNA nakładano obie sondy jednocześnie. Inkubację prowadzono przez noc w opisanych warunkach. Po inkubacji preparaty płukano dwukrotnie po 5 minut w $4 \times \text{SSC}$, a następnie 5 minut w $2 \times \text{SSC}$. Następnie:

a) W przypadku podwójnego znakowania (hybrydyzacja in situ i immunolokalizacja) kontynuowano procedurę zgodnie z opisem zawartym w kolejnym podrozdziale.

b) W przypadku znakowania wyłącznie przy użyciu hybrydyzacji in situ po odpłukaniu w $2 \times \text{SSC}$ wykonano barwienie DNA. Preparaty inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w roztworze Hoechst (1:2500 w $2 \times \text{SSC}$). Po barwieniu płukano je przez 5 minut w $2 \times \text{SSC}$, pozostawiano do wyschnięcia, a następnie zamykano odczynnikiem ProLong Gold, przedłużającym efekt fluorescencji.

Immunolokalizacja

Preparaty inkubowano z przeciwciałem pierwotnym w wilgotnej komorze wypełnionej PBS w 4°C przez noc:

- anti-m6A 1:200 w 1% BSA rozpuszczonym w PBS
- anti-PAB2 1:100 w 1% BSA rozpuszczonym w PBS
- any-DCP5 1:200 w 1% BSA rozpuszczonym w PBS

Preparaty odpłukiwano trzykrotnie przez 5 minut w PBS w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Następnie nakładano przeciwciało wtórne (antykrólicze znakowane Alexa 488, 1:250 w 1% BSA w PBS) i inkubowano w wilgotnej komorze na wytrząsarce (60 RPM) przez godzinę w temperaturze 35°C . Po dwukrotnym płukaniu przez 5 minut w PBS przeprowadzono barwienie DNA, inkubując preparaty w Hoechst (1:2500 w PBS) przez 10 minut w RT. Po płukaniu przez 5 minut w PBS preparaty suszono i zamykano odczynnikiem ProLong Gold.

Immunolokalizacja na poziomie ultrastrukturalnym

Ultracienkie skrawki preinkubowano w 1% BSA w PBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie nałożono królicze przeciwciało pierwotne anti-PAB2, rozcieńczone w stosunku 1:100 w 1% BSA w PBS, i inkubowano w wilgotnej komorze przez noc w 4°C . Po trzykrotnym odpłukaniu w PBS (5 minut), próbki inkubowano z kozim przeciwciałem wtórnym anti-króliczym, znakowanym 20 nm ziarnami złota, rozcieńczonym 1:50 w 1% BSA w PBS (pH 7,4), przez godzinę w wilgotnej komorze w 37°C . Niezwiązane przeciwciała usuwano poprzez trzykrotne płukanie przez 5 minut w wodzie destylowanej. Następnie skrawki

kontrastowano kolejno w 2,5% roztworze octanu uranylu (20 minut) oraz w 0,4% roztworze cytrynianu ołowiu (20 minut). Po każdym etapie kontrastowania siateczki płukano 5x3 minuty w wodzie destylowanej i pozostawiano do wysuszenia.

Reakcja kontrola

Dla każdej reakcji wykonywano kontrolę negatywną. Reakcje przeprowadzano według tego samego protokołu, natomiast w przypadku hybrydyzacji *in situ* pomijano dodanie sondy, z kolei przy immunolokalizacji nie stosowano przeciwciała pierwotnego.

Aby sprawdzić specyficzność przeciwciał anty-m6A stosowanych w reakcji immunolokalizacji, przetestowano trzy różne przeciwciała. Przeciwciało o najlepszej jakości sygnału poddano dodatkowej weryfikacji specyficzności. W tym celu półcienkie skrawki inkubowano w roztworze 0,1 % RNazy A przez 30 minut w 37°C. Następnie, po trzykrotnym płukaniu w PBS (5 minut), przeprowadzano reakcję immunolokalizacji m6A zgodnie z opisanym wcześniej protokołem.

4.6.3 Mikroskopia

Mikroskopia konfokalna

Wyniki rejestrowano za pomocą oprogramowania FV3000 (Evident Technology Center Europe) oraz konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego Olympus FV3000, wyposażonego w immersyjny obiektyw 60× (apertura numeryczna 1,4). Aby uniknąć nakładania się sygnałów między kanałami, obrazy pozyskiwano sekwencyjnie w kanałach czerwonym (Cy3), zielonym (Alexa Fluor 488) i niebieskim (Hoechst 33342). Przekroje optyczne rejestrowano z interwałem 0,5 μm. Zdjęcia przeznaczone do analiz ilościowych były wykonywane w stałych warunkach akwizycji, obejmujących moc lasera, pasmo emisji, wzmocnienie, rozdzielczość oraz powiększenie.

Mikroskopia wysokorozdzielcza

Lokalizacja pojedynczych cząsteczek poli(A) RNA na półcienkich skrawkach korzenia *L. angustifolius* została wykonana przy użyciu mikroskopu Bruker Vutara VXL z oświetleniem szerokokątnym i detekcją Bi-plane do akwizycji 3D. Obraz rejestrowano przy następujących parametrach: 20ms czas ekspozycji, 90% moc lasera 638 nm, filtr emisji nm dla kanału Cy5 oraz 50 próg tła zastosowany w algorytmie lokalizacji. Analiza klastrów sygnału przeprowadzona została z parametrami: algorytm DBSCAN, 0,3 μm maksymalna odległość

między cząsteczkami, 50 minimalna ilość cząsteczek do wygenerowania klastra, 50 nm izopowierzchnia cząsteczki.

Mikroskopia elektronowa

Wykonane preparaty obserwowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEOL EM 1010.

Analiza obrazu i ilościowy pomiar sygnału fluorescencji

Aby obliczyć natężenie sygnału fluorescencji uzyskanego podczas hybrydyzacji *in situ* poli(A) RNA oraz zmierzyć średnicę SGs, analizowano co najmniej 60 komórek dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentalnych. Natężenie sygnału sond do poszczególnych mRNA mierzono w 40–60 komórkach. Obrazy przetwarzano i analizowano za pomocą oprogramowania ImageJ (Schneider i wsp., 2012). Na podstawie natężenia autofluorescencji z reakcji kontrolnych ustalono wartość odcięcia tła, która posłużyła do korekcji danych. Poziom sygnału wyrażano we względnych jednostkach fluorescencji lub jako względną intensywność fluorescencji na μm^2 . Pomiar natężenia fluorescencji dla badanych mRNA przeprowadzano zarówno w SGs, jak i w cytoplazmie, w 3 arbitralnie wybranych miejsca o rozmiarach odpowiadających SGs.

4.7 ANALIZY TRANSKRYPTOMICZNE

4.7.1 Izolacja RNA

W trakcie izolacji wszelkie wykorzystane materiały i odczynniki były wolne od RNaz. Zamrożone korzenie *L. angustifolius* ucierano w schłodzonym ciekłym azocie w moździerzu. Następnie odważano 100 mg utartego materiału i przenoszono do nowej probówki typu eppendorf. Do prób dodawano 1000 μl odczynnika TRIzol i worteksowano przez 30 sekund. Próby inkubowano przez 6 minut w RT, kilkakrotnie mieszając przez odwracanie probówki. Następnie wirowano przez 10 minut przy prędkości $12000 \times g$ w 4°C . Supernatant przenoszono do nowego eppendorfa, dodawano 200 μl chloroformu, mieszano poprzez worteksowanie i inkubowano przez 5 minut w RT. Po inkubacji próby wirowano przez 15 minut, $12000 \times g$ w 4°C . Górną, wodną fazę uzyskaną po wirowaniu przenoszono do nowego eppendorfa, po czym dodawano 500 μl izopropanolu. Po inkubacji przez 5 minut w RT próby ponownie wirowano przez 10 minut przy $12000 \times g$ w 4°C . Supernatant ostrożnie zlewano, a osad RNA przepłukiwano dwukrotnie schłodzonym 75% alkoholem etylowym. Po każdym płukaniu

próby wirowano przez 5 minut przy $7500 \times g$ w 4°C , a supernatant zlewano. Po ostatnim płukaniu osad RNA suszono przez 10 minut w RT przy otwartym wieczku próbówki, a następnie zawieszano w 15 μl wody wolnej od RNaz.

Wszystkie próby RNA poddawano procesowi DNazowania z użyciem zestawu odczynników RQ1 RNase-Free DNase zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, do każdej próby RNA dodawano 2 μl 10 x buforu reakcyjnego, 1 u/ μg RNA DNazy, a następnie uzupełniano wodą wolną od RNaz do objętości 20 μl . Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut, po czym dodawano 1 μl RQ1 DNase Stop Solution i poddawano inkubacji w 65°C przez 10 minut, w celu inaktywacji enzymu.

4.7.2 Izolacja poli(A) RNA

RNA przeznaczone do reakcji immunoprecypitacji m6A oraz przygotowania bibliotek cDNA poddawano izolacji poli(A) RNA z użyciem zestawu odczynników PolyATtract® mRNA Isolation Systems zgodnie z zaleceniami producenta. Do izolacji wykorzystano 900 μg RNA całkowitego na próbę. W skrócie, próby uzupełniano wodą wolną od RNaz do 500 μl i inkubowano w 65°C przez 10 minut. Po zakończeniu inkubacji dodawano 3 μl sondy Biotinylated-Oligo(dT), komplementarnej do ogonów poli(A), oraz 25 μl 20 x SSC, a następnie delikatnie mieszano i pozostawiano do ostygnięcia w temperaturze pokojowej. W tym czasie przygotowywano kulki magnetyczne, które płukano trzykrotnie w 300 μl 0,5 x SSC na statywie magnetycznym, a następnie zawieszano w 100 μl 0,5 x SSC. Do kulek dodawano wcześniej przygotowaną mieszaninę RNA i inkubowano przez 10 minut w RT, mieszając przez odwracanie probówek co 1–2 minuty. Po inkubacji próby umieszczano na statywie magnetycznym, odciągano supernatant, a kulki płukano trzykrotnie w 300 μl 0,2 \times SSC. Kulki zawieszano w 100 μl wody wolnej od RNaz, ponownie umieszczano na statywie magnetycznym, a supernatant zawierający wyizolowane poli(A) RNA przenoszono do nowego eppendorfa. Etap elucji powtarzano dwukrotnie.

4.7.3 Fragmentacja poli(A) RNA

Poli(A) RNA przeznaczone do analizy MeRIP-Seq poddano fragmentacji przy użyciu zestawu NEBNext® Magnesium RNA Fragmentation Module, zgodnie z zaleceniami producenta, uzyskując fragmenty o długości około 150 nt. Do 18 μl wyizolowanego poli(A) RNA dodawano 2 μl 10 x buforu do fragmentacji, a następnie próby inkubowano przez 3 minuty

w temperaturze 94°C. Po zakończeniu inkubacji reakcję zatrzymywano, przenosząc próby na lód i dodając 2 µl 10× RNA Fragmentation Stop Solution.

Do pofragmentowanego poli(A) RNA dodawano 5× objętości alkoholu etylowego, 0,1× objętości octanu sodowego (NaAc) oraz 1 µl odczynnika Glycoblue. Mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze -20°C. Następnego dnia próby wirowano przez 30 minut przy 12 000× g w 4°C, a powstały osad przemywano schłodzonym 75% alkoholem etylowym. Osad osuszano w temperaturze pokojowej, a następnie zawieszano w 11 µl wody wolnej od RNaz.

4.7.4 Immunoprecypitacja m6A

Reakcję immunoprecypitacji m6A przeprowadzono z użyciem zestawu EpiMark N6-Methyladenosine Enrichment Kit, wykorzystując 9 µg poli(A) RNA na próbę. Pofragmentowane poli(A) RNA po immunoprecypitacji służyło do przygotowania bibliotek cDNA, natomiast niefragmentowane poli(A) RNA wykorzystywano do reakcji RT-qPCR. Do oceny efektywności immunoprecypitacji przygotowano próbę kontrolną zawierającą 3 µl RNA wzorcowego z m6A (Gluc) oraz 3 µl RNA wzorcowego bez m6A (Cluc). Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, wprowadzając kilka modyfikacji. W skrócie, 25 µl kulek magnetycznych Dynabeads protein G (na próbę) przemywano dwukrotnie w 200 µl buforu IP z dodatkiem 0,075% NP-40, po czym zawieszano w 250 µl buforu IP z NP-40. Do kulek dodawano 2 µl przeciwciała anty-m6A (z zestawu) na próbę i inkubowano na wytrząsarce rotacyjnej przez 1 godzinę w 4°C z prędkością 2–4 RPM. Kulki przemywano dwukrotnie w 200 µl buforu IP z NP-40, a następnie zawieszano w 250 µl buforu IP z NP-40. Do prób poli(A) RNA dodawano 1 µl RNA wzorcowego zawierającego m6A oraz 1 µl RNA wzorcowego pozbawionego m6A (rozcieńczone 1:1000). Ten etap pomijano w próbach przeznaczonych do sekwencjonowania. RNA uzupełniano wodą wolną od RNaz do 13 µl, z czego 10% objętości (1,3 µl) odkładano jako próbę wejściową (input). Resztę poli(A) RNA, wraz z 3 µl inhibitora RNaz, dodawano do przygotowanych kulek magnetycznych i inkubowano przez 2 godziny w 4°C przy 3 RPM. Po inkubacji kulki przemywano kolejno: 2 x 200 µl buforu IP z 0,075% NP-40, 1 x 200 µl HSB z 0,075% NP-40, 1 x 200 µl HSB, 2 x 200 µl LSB. Na koniec kulki zawieszano w 40 µl buforu IP, dodawano 4 µl proteiny K oraz 0,4 µl 10% SDS i inkubowano przez 1 godzinę w 56°C. Po inkubacji próby umieszczano na statywie magnetycznym, a supernatant, zawierający m6A poli(A) RNA, przenoszono do nowego eppendorfa. Do prób dodawano 500 µl odczynnika TRIzol, worteksowano i inkubowano w RT przez 6 minut. Następnie dodawano 100 µl chloroformu, mieszano i

wirowano przez 15 minut przy $12\ 000 \times g$ w 4°C . Fazę wodną przenoszono do nowego eppendorfa i strącano RNA według wcześniej opisanej procedury.

4.7.5 Odwrotna transkrypcja i reakcja qPCR

Odwrotna transkrypcja

W celu syntezy cDNA wykorzystywanego w analizach qPCR, RNA poddawano odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. Do każdej reakcji używano $3\ \mu\text{g}$ RNA całkowitego lub $10\ \mu\text{l}$ m6A poli(A) RNA na próbę.

- W przypadku RNA całkowitego stosowano startery komplementarne do ogona poli(A) (Anchored Oligo(dT)₁₈ Primer).
- Dla m6A poli(A) RNA stosowano startery losowe (Random Hexamer Primer).

Reakcje prowadzono według następującego programu:

Etap	Temperatura	Czas
Anchored Oligo(dT)₁₈ Primer		
Denaturacja RNA	65°C	10 minut
Odwrotna transkrypcja	55°C	30 minut
Inaktywacja enzymu	85°C	5 minut
Random Hexamer Primer		
Denaturacja RNA	65°C	10 minut
Odwrotna transkrypcja etap I	25°C	10 minut
Odwrotna transkrypcja etap II	55°C	30 minut
Inaktywacja enzymu	85°C	5 minut

Uzyskane cDNA przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

PCR w czasie rzeczywistym

Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej zastosowano odczynnik LightCycler® 480 SYBR Green I Master. Skład mieszaniny obejmował: $5\ \mu\text{l}$ 2 x stężony Master Mix, $3\ \mu\text{l}$ wody wolnej od RNaz, $1\ \mu\text{l}$ pary specyficznych starterów o stężeniu $0,2\ \mu\text{M}$. Mieszaninę pipetowano do dołków płytki 96-dołkowej, po czym dodawano $1\ \mu\text{l}$ matrycy cDNA. Płytkę worteksowano 30 sekund i wirowano przez 2 minuty w $1500 \times g$. Reakcję prowadzono w wykorzystaniem termocyklera LightCycler 96 (Roche), z następującym profilem termicznym:

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Preinkubacja	95°C	5 minut	1
Amplifikacja	95°C	10 sekund	45
	52°C	10 sekund	
	72°C	20 sekund	
Krzywa topnienia	95°C	5 sekund	1
	65°C	60 sekund	
	97°C	1 sekunda	
Chłodzenie	40°C		1

Względny poziom ekspresji genów i metylowanych mRNA

Wszystkie próby analizowano w trzech powtórzeniach. Względny poziom ekspresji genów obliczano na podstawie numeru cykli progowych (Ct) amplikonów badanych genów oraz genu referencyjnego UBC5, którego poziom oznaczano równoległe z badanymi mRNA. Gen UBC5, będący stabilnym genem referencyjnym u *L. angustifolius* (Taylor i wsp., 2016), charakteryzował się stałą wartością Ct we wszystkich analizowanych warunkach. Ekspresję genów wyliczano przy użyciu metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Wydajność reakcji qPCR weryfikowano na podstawie krzywych standardowych, przygotowanych dla genów badanych oraz genu referencyjnego, z wykorzystaniem serii rozcieńczeń matrycy cDNA.

Względny poziom metylowanych transkryptów wyznaczano, analizując różnicę Ct amplikonów badanych w próbach przed (input) i po (IP) immunoprecypitacji. Wyliczenia prowadzono zgodnie z metodą $2^{-\Delta CT}$, gdzie wartość ΔCt była normalizowana względem ΔCt_{IP} , ΔCt_{input} oraz współczynnika rozcieńczenia inputu.

4.7.6 Przygotowanie bibliotek cDNA

Wyizolowane poli(A) RNA, po przeprowadzeniu analizy ilościowej i jakościowej, wykorzystywano jako matrycę do syntezy bibliotek cDNA przeznaczonych do sekwencjonowania. Do ich przygotowania używano zestawu odczynników NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Proces przygotowania bibliotek obejmował następujące etapy: fragmentację RNA, syntezę pierwszej nici cDNA, syntezę drugiej nici cDNA, adenylację końców 3', ligację adaptorów oraz wzbogacenie i indeksowanie bibliotek w reakcji PCR. Do indeksowania stosowano zestaw

NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1). Po każdym etapie dwuniciowe cDNA oczyszczano przy użyciu kulek magnetycznych AMPure XP Beads.

Do przygotowania bibliotek z m6A poli(A) RNA stosowano ten sam zestaw odczynników, NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina, przy czym syntezę bibliotek rozpoczynano od etapu syntezy pierwszej nici cDNA, ponieważ RNA było już fragmentowane przed procesem immunoprecypitacji. Syntezę drugiej nici przeprowadzano z użyciem odczynnika NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Second Strand Synthesis Module, wykorzystującym metodę „dUTP” dla uzyskania bibliotek specyficznych dla nici. Pozostałe etapy syntezy przeprowadzano zgodnie z powyższym opisem.

4.7.8 Sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna

Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie zostało wykonane przez firmę Genomed (Warszawa, Polska). Biblioteki cDNA zostały zaindeksowane przy pomocy zestawu TruseqHT. Sekwencjonowanie odbyło się na sekwenatorze NovaSeq6000 (Illumina) w trybie PE150, z założeniem 20 mln par odczytów na próbkę.

Analiza bioinformatyczna RNA-Seq

Kontrola jakości surowych odczytów sekwencjonowania została przeprowadzona za pomocą programu FastQC (Andrews, 2010) a następnie wykonano filtrowanie odczytów oraz przycinanie adaptorów za pomocą narzędzia BBDUK z pakietu BBMAP. Odczyty odpowiadające rRNA zostały odrzucone przy użyciu Bowtie2 (Langmead i wsp. 2018), wykorzystując sekwencje rybosomalnego RNA *L. angustifolius* dostępne w bazie Ensembl Plants 56. Oczyszczone odczyty oraz genom łubinu (LupAngTanjil_v1.0) posłużyły do złożenia transkryptomu *ab initio* przy pomocy StringTie (Pertea i wsp. 2016). Złożony transkryptom został następnie porównany z transkryptomem referencyjnym (LupAngTanjil_v1.0.55) uzyskanym z Ensembl Plants 56 (Yates i wsp. 2022) przy użyciu narzędzia Cuffcompare (Trapnell i wsp. 2012), aby zidentyfikować wcześniej adnotowane transkrypty. Dalszą charakterystykę transkryptomu przeprowadzono, wykorzystując znane ortologi genów *A. thaliana* pobrane z Ensembl Plants. Narzędzie TransDecoder (Haas i wsp. 2013) umożliwiło identyfikację przewidywanych otwartych ramek odczytu (ORF) oraz kodowanych białek, które poddano analizie w BLASTP (Camacho i wsp. 2009) z wykorzystaniem bazy danych SwissProt. Poziomy ekspresji genów obliczono przy pomocy RSEM (Li i Dewey, 2011), a

analizę różnicowej ekspresji przeprowadzono za pomocą DESeq2 (Love i wsp. 2014). Jedynie geny o wartości $p < 0,05$ zostały uznane za różnicowo eksprymowane. Wyniki wizualizowano w formie wykresów w R/RStudio z wykorzystaniem pakietu ggplot2 (Wickham, 2016) dostępnego w repozytorium Bioconductor. Analiza nadreprezentacji terminów Gene Ontology (GO) dla genów o zwiększonej i zmniejszonej ekspresji została przeprowadzona przy użyciu pakietu clusterProfiler (Wu i wsp. 2021). Dla każdego porównania analizowano jedynie 1000 genów o najniższej wartości padj (uzyskanej za pomocą DESeq2) i wykazujących co najmniej dwukrotną zmianę poziomu ekspresji.

Analiza bioinformatyczna MeRIP-Seq

Analogicznie jak w analizie RNA-Seq, kontrolę jakości surowych odczytów MeRIP-Seq, filtrowanie odczytów i eliminację sekwencji rRNA przeprowadzono przy użyciu FastQC, BBDUK i Bowtie2. Oczyszczone odczyty zostały zmapowane do genomu referencyjnego za pomocą programu STAR (Dobin i wsp. 2013). Narzędzia samtools i bamCoverage z pakietu deepTools (Ramirez i wsp. 2016) zostały wykorzystane do scalenia powtórzeń biologicznych oraz wygenerowania plików do wizualizacji w przeglądarce genomowej. Dystrybucję m6A w obrębie transkryptów przedstawiono za pomocą programu plotProfile z pakietu deepTools. Poziomy ekspresji obliczono przy użyciu programu StringTie, który dostarczył zarówno surowe, jak i znormalizowane (FPKM ang. Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) wartości ekspresji dla poszczególnych genów/transkryptów. Analizę genów różnicowo eksprymowanych wykonano z zastosowaniem pakietu DESeq2. Aby zbadać zależność między wzbogaceniem m6A a poziomem ekspresji, dane dotyczące różnicowo eksprymowanych genów oraz wartości wzbogacenia m6A zilustrowano na wykresach, wygenerowanych w środowisku R z użyciem pakietu ggplot2. Następnie w R za pomocą pakietu clusterProfiler, przeprowadzono funkcjonalną analizę terminów GO (Wu i wsp. 2021).

4.7.9 Ocena jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych

Spektrofotometria

Analizę spektrofotometryczną ilości i jakości RNA oraz bibliotek cDNA przeprowadzono na urządzeniu NanoDrop One (Thermo Scientific). Absorbancję kwasów nukleinowych mierzono przy długości fal 230 nm, 260 nm, 280 nm i na ich podstawie wyliczano stosunek A_{260}/A_{280} i $A_{260}/230$ informujący odpowiednio o zanieczyszczeniu prób białkami i pozostałościami odczynników do izolacji.

Fluorymetria

Analizę ilościową uzyskanych bibliotek cDNA wykonano metodą fluorymetryczną przy użyciu urządzenia Qubit (Thermo Scientific). Do oznaczenia stężenia cDNA zastosowano zestaw odczynników Qubit dsDNA HS Assay Kit, a całą procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta.

Elektroforeza w żelu agarozowym

Stopień degradacji RNA oceniano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym. Do każdej próby RNA (4 µl) dodawano 4 µl buforu obciążającego 2× RNA Loading Buffer, mieszano przez pipetowanie, a następnie наносono na studzienki żelu. W jedną ze studzienek wprowadzano 5 µl wzorca RNA – RiboRuler High Range RNA Ladder. Elektroforezę prowadzono przez około 30 minut przy napięciu 110 V. Wizualizację wykonano na aparacie ChemiDoc (Bio-Rad).

Analizę produktów reakcji PCR mieszańców *A. thaliana* przeprowadzono w 2% żelu agarozowym. Do 5 µl próby DNA dodawano 1 µl buforu obciążającego 6× Loading Buffer BLUE, mieszano przez pipetowanie, po czym наносono na studzienki żelu. W jedną ze studzienek wprowadzano 5 µl wzorca DNA – Perfect Plus 2 kb DNA Ladder. Elektroforezę prowadzono przez około 30 minut przy napięciu 110 V. Wizualizację wykonano na aparacie ChemiDoc (Bio-Rad).

Elektroforeza kapilarna

Wyizolowane RNA przeznaczone do reakcji immunoprecypitacji m6A oraz przygotowania bibliotek cDNA analizowano również za pomocą urządzenia Bioanalyzer 2100 (Agilent). Dodatkowo oceniano poli(A) RNA po fragmentacji do MeRIP-Seq w celu określenia wielkości uzyskanych fragmentów. Analizy prowadzono przy użyciu zestawu odczynników Agilent RNA 6000 Nano Kit, zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

4.8 ANALIZY STATYSTYCZNE

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów PAST (Hammer i wsp., 2001) oraz Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA). Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Do identyfikacji różnic między dwiema grupami zastosowano test t-Studenta. Normalność rozkładu danych weryfikowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku danych spełniających założenie normalności, do porównań wielu grup

stosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA), a w przypadku istotnych różnic przeprowadzano test HSD Tukeya. Jeśli dane nie spełniały założenia normalności, stosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, a następnie test post-hoc Dunna. Za statystycznie istotne uznawano porównania z wartością $p < 0,05$. Słupki błędów przedstawione na wszystkich rysunkach ilustrują średnie odchylenie standardowe uzyskane z wszystkich powtórzeń.

WYNIKI

5.1 POWSTAWANIE GRANUL STRESOWYCH W KORZENIACH ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO (*L. ANGUSTIFOLIUS*) W TRAKCIE STRESU NIEDOTLENIENIA

Wcześniejsze badania prowadzone przez Niedojadło i wsp. (2016) wykazały, że stres niedotlenienia prowadzi do kumulacji mRNA, zarówno na terenie jądra komórkowego, jak i w postaci skupisk cytoplazmatycznych przypominających granule stresowe (SG). W celu identyfikacji tych struktur w cytoplazmie oraz charakterystyki kolejnych etapów ich formowania, wykorzystując techniki immunofluorescencji i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) przeprowadzono kolokalizację białka znacznikowego SG - PAB2 (z ang. polyadenylate-binding protein 2) oraz poli(A) RNA w utrwalonych protoplastach komórek merystematycznych korzeni łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) poddanych stresowi hipoksji (Ryc. 1A-S). Następnie dokonano analizy ilościowej uzyskanych sygnałów fluorescencji z uwzględnieniem poszczególnych struktur komórkowych (Ryc. 1T-W).

Obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wykazało, że w warunkach kontrolnych, zbliżonej intensywności sygnał sondy komplementarnej do poli(A) RNA występował homogenicznie na terenie cytoplazmy oraz poza jąderkowej części nukleoplazmy (Ryc. 1A). Podobną dystrybucję fluorescencji zaobserwowano dla białka wiążącego ogon poli(A) cząsteczek mRNA - PAB2, będącego białkiem markerowym SG (Ryc. 1B) (Kosmacz i wsp. 2019). Nałożenie fluorescencyjnego sygnału PAB2 oraz poli(A) RNA wykazało silną ich kolokalizację na terenie jądra i cytoplazmy (Ryc. 1C).

Krótkie, jednogodzinne niedotlenienie skutkowało wyraźnym wzrostem intensywności fluorescencji sondy komplementarnej do poli(A) na terenie całej komórki (Ryc. 1D, 1T). Wysoki sygnał w jądrze komórkowym wyróżniał się na tle sygnału cytoplazmatycznego. Dodatkowo na terenie jądra, poza homogenną fluorescencją, zaobserwowano pojedyncze skupiska sygnału. Jąderko, tak jak miało to miejsce w warunkach kontrolnych, pozbawione było fluorescencji. W cytoplazmie z kolei, zmieniła się dystrybucja poli(A) RNA. Sygnał stracił na homogenności, co przejawiało się obszarami o wyraźnie niższym poziomie fluorescencji. Ponadto pojawiły się zbliżone rozmiarami i kształtem liczne skupiska poli(A) RNA (Ryc. 1D). Jednakową tendencję zmian lokalizacji i intensywności sygnału zaobserwowano dla PAB2. Również w tym przypadku, w cytoplazmie komórki obecne były skupiska tego białka, jednakże o zróżnicowanym poziomie fluorescencji (Ryc. 1E). Te ze skupisk, które charakteryzowały się silnym sygnałem kolokalizowały z ogniskami poli(A) RNA (Ryc. 1F). Na podstawie

uzyskanych wyników, w tym reakcji z cykloheksymidem (patrz Rozdział 5.2), bogate w poli(A) RNA struktury cytoplazmatyczne, zostały zidentyfikowane jako granule stresowe. Zawierały one 3,3% puli cytoplazmatycznego mRNA (Ryc. 1W).

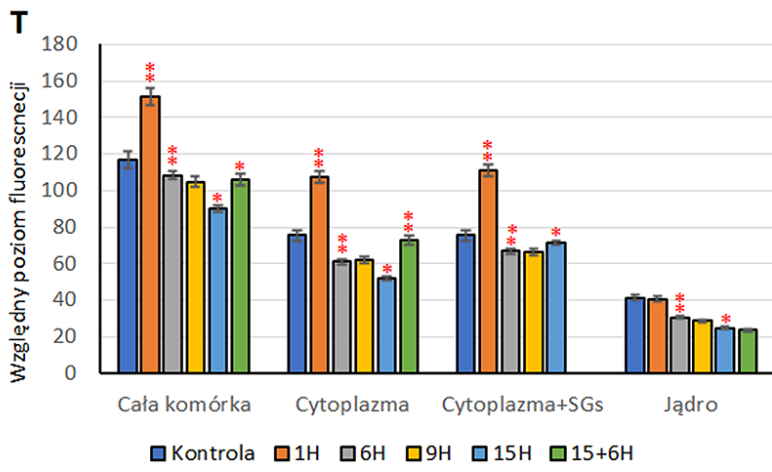
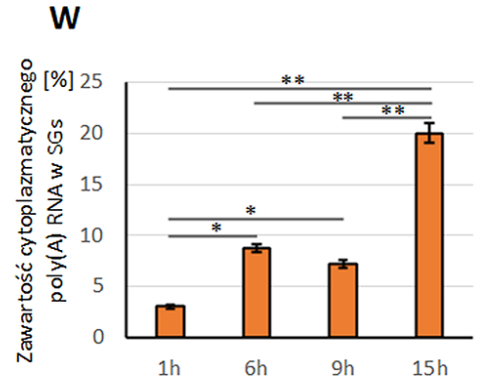
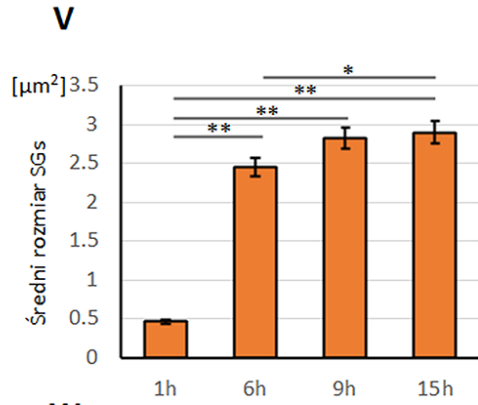
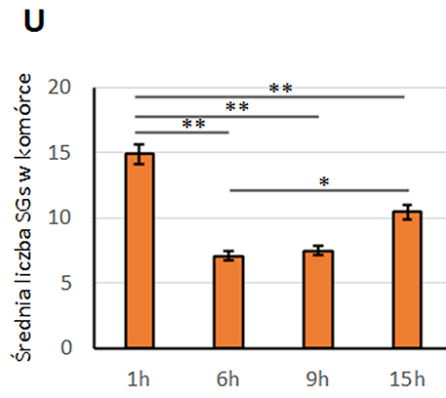
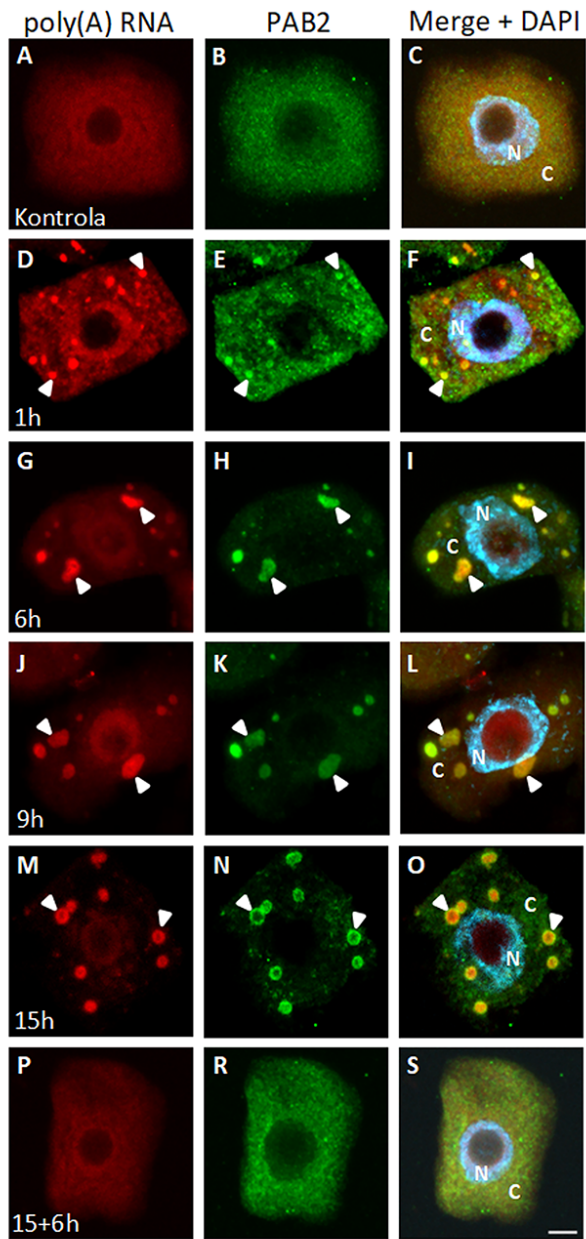
W trakcie kolejnych sześciu godzin niedotlenienia obserwowano widoczny spadek poziomu sygnału poli(A) RNA i PAB2 na terenie cytoplazmy i jądra komórkowego (Ryc. 1G, 1T). Fluorescencja świadcząca o obecności poli(A) RNA pojawiła się w jąderku oraz na niższym poziomie obecna była w nukleoplazmie. Wyraźnie zmienił się także charakter obecnych w cytoplazmie SG. Ich liczba zmniejszyła się o połowę w odniesieniu do jednej godziny niedotlenienia (Ryc. 1U). Ponadto zauważalna stała się dysproporcja w kształcie i rozmiarze pomiędzy poszczególnymi granulami. Stały się one ponad czterokrotnie większe (Ryc. 1V), o wydłużonym kształcie i składały się z kilku pojedynczych, okrągłych SG. Powyższa obserwacja wskazuje, że po sześciu godzinach hipoksji następuje łączenie się pojedynczych granул stresowych w większe struktury. Jednocześnie w cytoplazmie obecne były także granule stresowe niewielkich rozmiarów, o wyraźnie niższym poziomie sygnału reakcji.

Podczas dziewięciogodzinnego niedotlenienia nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomach intensywności fluorescencji oraz dystrybucji PAB2 oraz poli(A) RNA w odniesieniu do sześciogodzinnego niedotlenienia (Ryc. 1J-K, 1T). W niewielkim stopniu zwiększył się rozmiar granул stresowych, jednakże analiza wielkości struktur nie wykazała istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do sześciogodzinnej hipoksji (Ryc. 1V). Nadal widoczne było dalsze łączenie się SG.

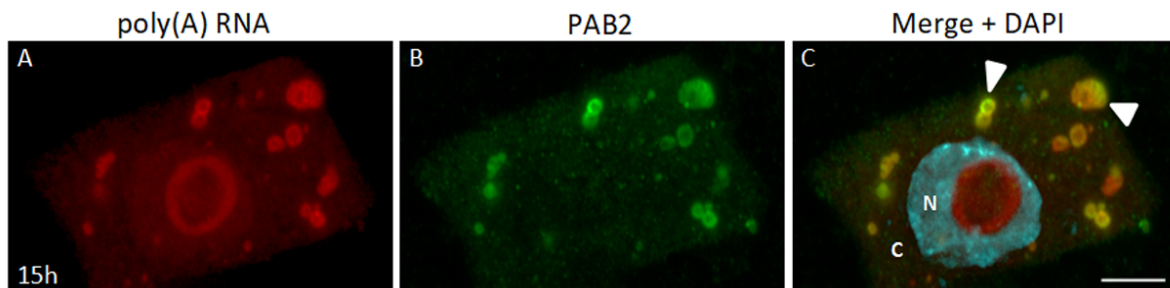
Wydłużona, piętnastogodzinna hipoksja prowadziła do obniżenia intensywności sygnału poli(A) RNA całej komórki. W tym okresie były to najniższe poziomy fluorescencji spośród wszystkich badanych wariantów trwania hipoksji, zarówno na terenie jądra, jak i cytoplazmy. Jedyne wzrost poziomu fluorescencji zaobserwowano w SG (Ryc. 1M, 1T). Sygnał jądrowy zlokalizowany był głównie w jąderku oraz w niewielkim stopniu w nukleoplazmie. Z kolei sygnał z cytoplazmy w większości skoncentrowany był w silnie wyznakowanych, okrągłych SG. W porównaniu do sześciu- i dziewięciogodzinnego niedotlenienia, zaobserwowano wzrost rozmiarów oraz liczby granул stresowych w cytoplazmie (Ryc. 1U, 1V). Co ciekawe, w tym okresie, dobrze widoczne były zmiany w dystrybucji sygnału poli(A) RNA i PAB2 w obrębie SG. Granule stresowe przejawiały dwustrefową strukturę: silnie wyznakowany pierścień oraz obszar centralny o słabszym natężeniu fluorescencji, osiągając wartość 20,4% obecnych w cytoplazmie transkryptów wyposażonych w ogon poli(A) (Ryc. 1W). Warto zaznaczyć, że podobne struktury obserwowano w komórkach zróżnicowanych

korzeni łubinu, co dowodzi, że SG nie są specyficzne wyłącznie dla komórek merystematycznych korzeni (Ryc. 2 A-C).

Następujące po piętnastogodzinnej hipoksji, sześciogodzinne ponowne natlenienie wywołało wzrost poziomu sygnału poli(A) RNA w komórce (Ryc. 1P, 1T). Sygnał w jądrze zlokalizowany był głównie w nukleoplazmie poza jąderkiem, jednakże jego intensywność pozostała na poziomie obserwowanym w jądrach komórkowych podczas piętnastogodzinnej hipoksji (Ryc. 1T). Znacząco zwiększyła się natomiast intensywność homogenego sygnału w cytoplazmie, w której nie stwierdzono obecności granул stresowych. Podobną, silnie kolokalizującą z poli(A) RNA dystrybucję sygnału obserwowano w przypadku PAB2 (Ryc. 1 R-S).



Ryc. 1 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i białka znacznikowego SGs PAB2 (zielona fluorescencja) w protoplastach komórek merystematycznych korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C), hipoksji (1h, 6h, 9h, 15h D-O) i reoksygenacji (15+6h; P-S). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L, O, S). Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m. Średnia liczba SGs (U), rozmiar SGs (V), zawartość cytoplazmatycznego poli(A) RNA w SGs (W) na komórkę, oraz względny poziom fluorescencji (T) w kolejnych godzinach niedotlenienia (1h, 6h, 9h, 15 h). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice wskazuje symbol: (*) pomiędzy oznaczonymi porównaniami, (*) w porównaniu do poprzedniego stadium (**/** $P < 0,01$, */* $P < 0,05$).



Ryc. 2 Lokalizacja poli(A) RNA (A) i białka PAB2 (B) w protoplastach komórek zróżnicowanych korzeni *L. angustifolius* w warunkach niedotlenienia (15 h). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C), Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m.

5.2 WPŁYW CYKLOHEKSYMIDU NA POWSTAWANIE GRANUL STRESOWYCH W KORZENIACH *L. ANGUSTIFOLIUS*

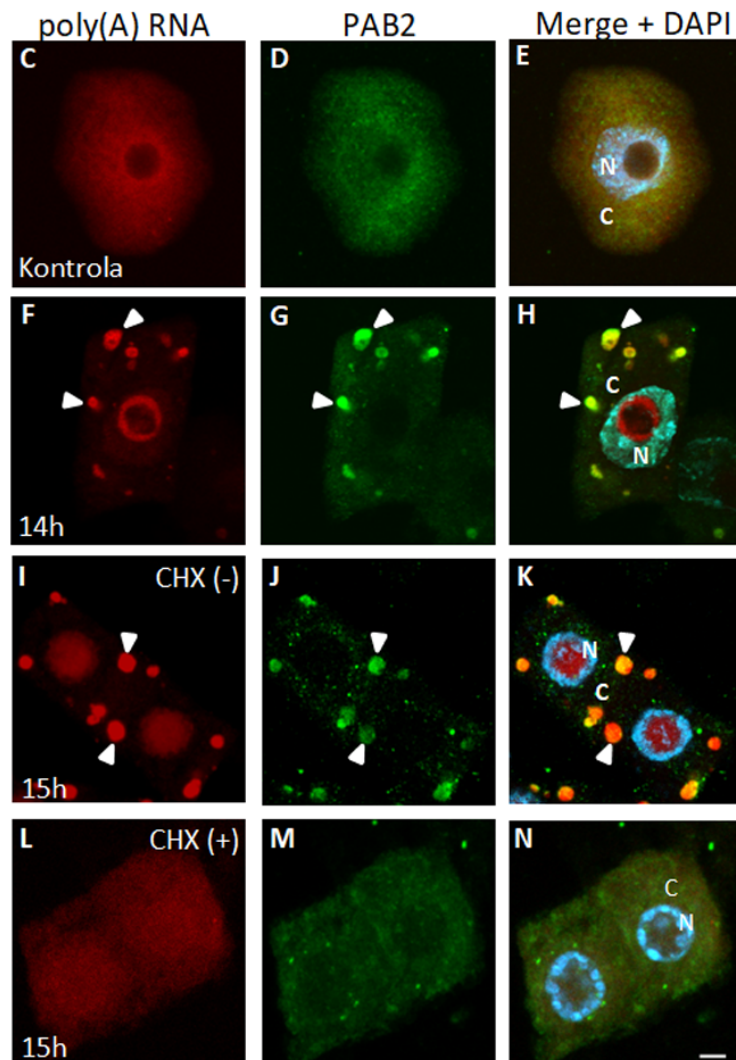
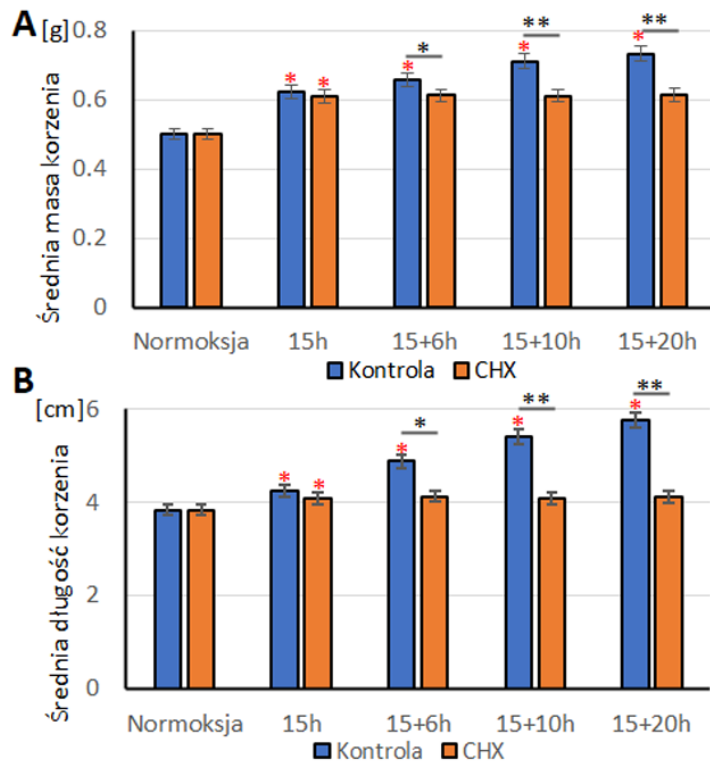
W celu dodatkowej weryfikacji, czy obserwowane w trakcie stresu niedotlenienia cytoplazmatyczne ogniska fluorescencji poli(A) RNA oraz PAB2 lokalizowane są w granulach stresowych, korzenie łubinu w trakcie hipoksji poddano działaniu cykloheksymidu. Cykloheksymid poprzez zatrzymanie etapu elongacji w procesie translacji prowadzi do zablokowania rozpadu polisomów, ograniczając tym samym pulę wolnych kompleksów mRNP wchodzących w skład granul stresowych.

W badaniach wstępnych, aby potwierdzić działanie cykloheksymidu, porównano zmiany masy i długości korzeni w trakcie piętnastogodzinnej hipoksji oraz w kolejnych godzinach ich ponownego natlenienia, zarówno w grupie kontrolnej, jak i poddanej dodatkowo jednogodzinnemu działaniu inhibitora. Podczas hipoksji masa korzeni wzrosła o około 20% w obu grupach w porównaniu do masy przed wystąpieniem stresu (Ryc. 3A). Przywrócenie warunków fizjologicznych nie wpłynęło na zmianę masy korzeni traktowanych cykloheksymidem. Masa ta utrzymywała się na stałym poziomie przez cały okres

reoksygenacji, w trakcie której korzenie były poddawane działaniu inhibitora. W przypadku grupy kontrolnej (nie poddanej działaniu inhibitora) masa korzeni zwiększała się przez cały czas trwania eksperymentu.

Taką samą korelację zaobserwowano w przypadku zmian długości korzeni. Po piętnastogodzinnym niedotlenieniu korzenie obu grup urosły o około 10% w stosunku do długości przed wywołaniem hipoksji (Ryc. 3B). W trakcie kolejnych godzin w warunkach fizjologicznych, długość korzeni traktowanych cykloheksymidem pozostawała taka sama, podczas gdy grupa kontrolna wykazywała ich wzrost.

Ustalono, że na skutek działania cykloheksymidu doszło do zatrzymania przyrostu biomasy korzeniowej, co wskazuje na jego aktywność w blokowaniu translacji w korzeniach *L. angustifolius*. Dlatego też wykonano znakowanie poli(A) oraz PAB2 w komórkach poddanych działaniu inhibitora syntezy białek. W materiale kontrolnym (nie poddanym działaniu cykloheksymidu) w trakcie czternastej i piętnastej godziny stresu niedotlenienia, na terenie cytoplazmy widoczne były bogate w poli(A) RNA i PAB2 SG (Ryc. 3F-K). W przypadku komórek traktowanych cykloheksymidem, nie zaobserwowano obecności żadnych skupisk cytoplazmatycznych (Ryc. 3L-N). Sygnał poli(A) RNA i PAB2 wykazywał rozproszoną dystrybucję na terenie cytoplazmy oraz jądra komórkowego. Uzyskany wynik wskazuje, że aktywność cykloheksymidu doprowadziła do rozpadu cytoplazmatycznych skupisk. Powyższe obserwacje oraz wyniki badań mikroskopowych dowodzą jednoznacznie, że struktury cytoplazmatyczne pojawiające się podczas niedotlenienia bogate w poli(A) RNA i PAB2 reprezentują granule stresowe.



Ryc. 3 Średnia masa (**A**) i długość korzeni (**B**) próby kontrolnej oraz poddanej działaniu cykloheksymidu (przez ostatnią, 15 godzinę hipoksji oraz w trakcie kolejnych godzin reoksygenacji) w warunkach fizjologicznych (Normoksja), niedotlenienia (15h) oraz ponownego natlenienia (15+6h, 15+10h, 15+20h). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotnie statystycznie różnice wskazuje symbol: (*) pomiędzy oznaczonymi porównaniami, (*) w porównaniu do poprzedniego stadium (**/** $P < 0,01$, */* $P < 0,05$). Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) w protoplastach komórek merystematycznych korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (**C-E**), 14h hipoksji przed dodaniem cykloheksymidu (**F-H**), 15h hipoksji bez cykloheksymidu (**I-K**), 15h hipoksji po dodaniu cykloheksymidu (**L-N**). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (**E, H, K, N**). Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm .

5.3 ANALIZA DWUSTREFOWEJ STRUKTURY GRANUL STRESOWYCH

Analiza kolejnych etapów powstawania SG w protoplastach komórek merystematycznych korzeni łąbinu ujawniła, że poliadenylowane RNA oraz PAB2 wykazują niejednorodną dystrybucję w obrębie badanych struktur. W celu weryfikacji dwustrefowej natury SG, detekcję testowanych cząsteczek przeprowadzono na półcienkich skrawkach korzeni *L. angustifolius* (Ryc. 4A-I). Obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej potwierdziło dwustrefowy wzorec lokalizacji obu badanych molekuł w SG w trakcie sześciu – piętnastu godzin hipoksji (Ryc. 4D-I). Poli(A) RNA obecne było głównie w pierścieniu, z wyraźnie mniejszą ilością w strefie centralnej, podczas gdy PAB2 zlokalizowano wyłącznie w intensywnie wyznakowanym pierścieniu tworzącym SG.

Następnie w celu precyzyjnego określenie rozkładu poliadenylowanego RNA na terenie granul stresowych, przeprowadzono obrazowanie techniką STORM z wykorzystaniem mikroskopii wysokorozdzielczej. Lokalizacja pojedynczych cząsteczek poli(A) RNA wykazała, że równomiernie rozłożony sygnał tworzył pierścień SG, a część centralna pozostawała wolna od fluorescencji, potwierdzając tym samym dwustrefową naturę granul stresowych (Ryc. 4J).

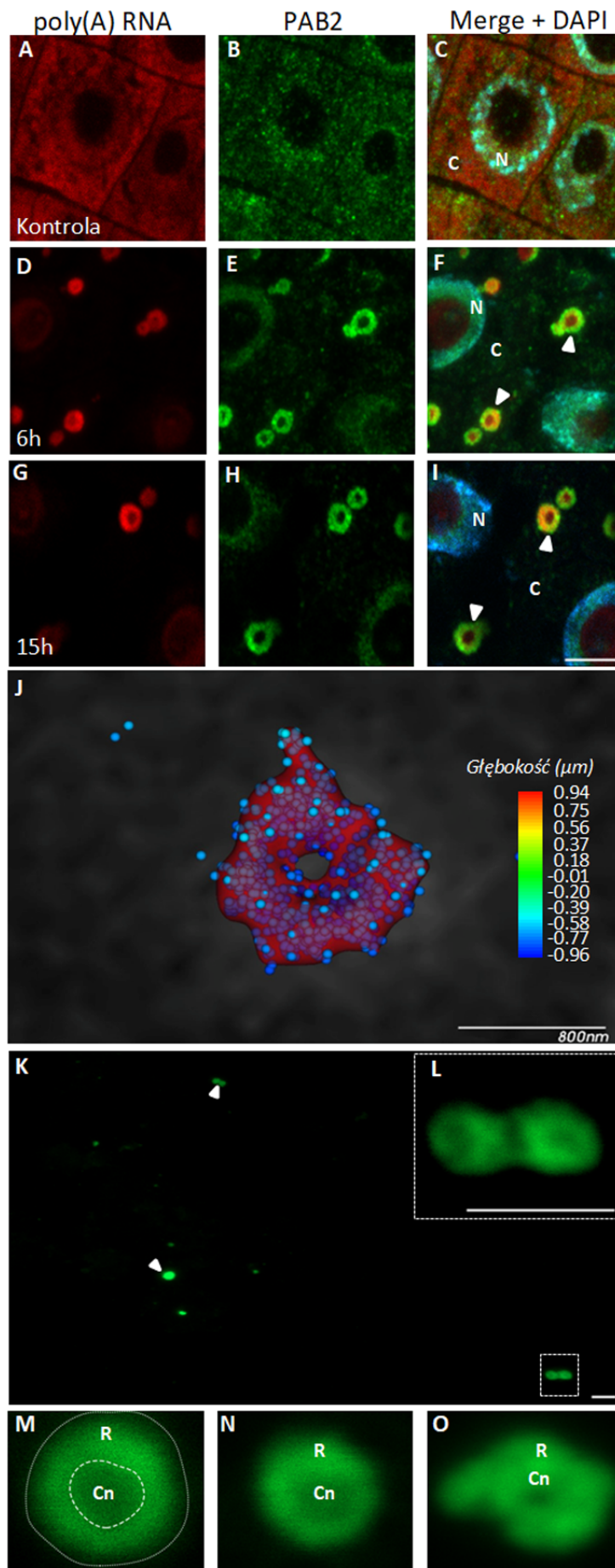
Co istotne, dwustrefową strukturę SG obserwowano niezależnie od zastosowanej metody preparatyki materiału roślinnego (protoplasty i skrawki). Jednak aby wykluczyć ewentualny wpływ długiego procesu utrwalania, zatopienia w żywicy na strukturę badanych skupisk cytoplazmatycznych, przeprowadzono izolację SG, a następnie zbadano rozkład PAB2 w ich obrębie. Metoda izolacji SG z korzeni *L. angustifolius* została opracowana na podstawie dostępnych danych literaturowych dotyczących pozyskiwania frakcji wzbogaconej w cytoplazmatyczne granule RNA u *A. thaliana* (Lei i wsp. 2021, Kosmacz i wsp. 2020) oraz dostosowana do specyfiki korzeni łąbinu. Na wyizolowanej frakcji SG przeprowadzono

immunolokalizację białka PAB2 (Ryc. 4K-O). Uzyskane wyniki wykluczają wpływ metody utrwalania i preparatyki korzeni na strukturę granul stresowych.

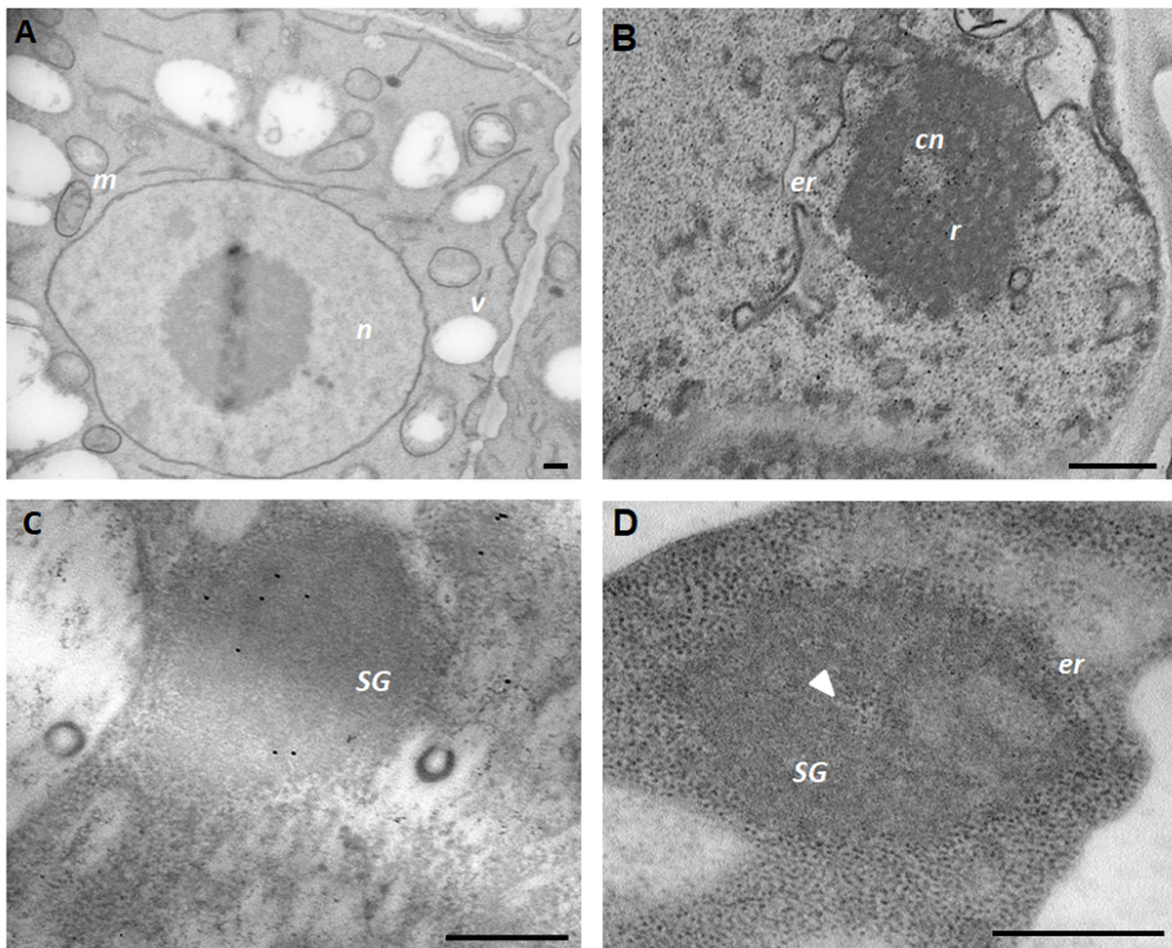
W kolejnym etapie badań w celu analizy ultrastrukturalnej SG zastosowano transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM). W warunkach kontrolnych nie zaobserwowano granul stresowych ani struktur cytoplazmatycznych przypominających SG (Ryc. 5A). W komórkach korzeni łubinu poddanych hipoksji w cytoplazmie występowały natomiast okrągłe, nieobłonione granule stresowe o średnicy 1,5-3 μm z elektronowo gęstym pierścieniem i jaśniejszym obszarem centralnym (Ryc. 5B). W celu upewnienia, czy opisywane struktury to SG przeprowadzono immunozłotową lokalizację z użyciem przeciwciał skierowanych do PAB2. Obecność ziaren złota nad cytoplazmatycznymi strukturami potwierdziła, że obserwowane w mikroskopie elektronowym ciała to SG (Ryc. 5C).

Wyniki uzyskane z zastosowaniem zróżnicowanych technik mikroskopowych oraz metod preparatyki materiału roślinnego do tych badań wskazują na obecność w komórkach korzeni łubinu dwustrefowych granul stresowych.

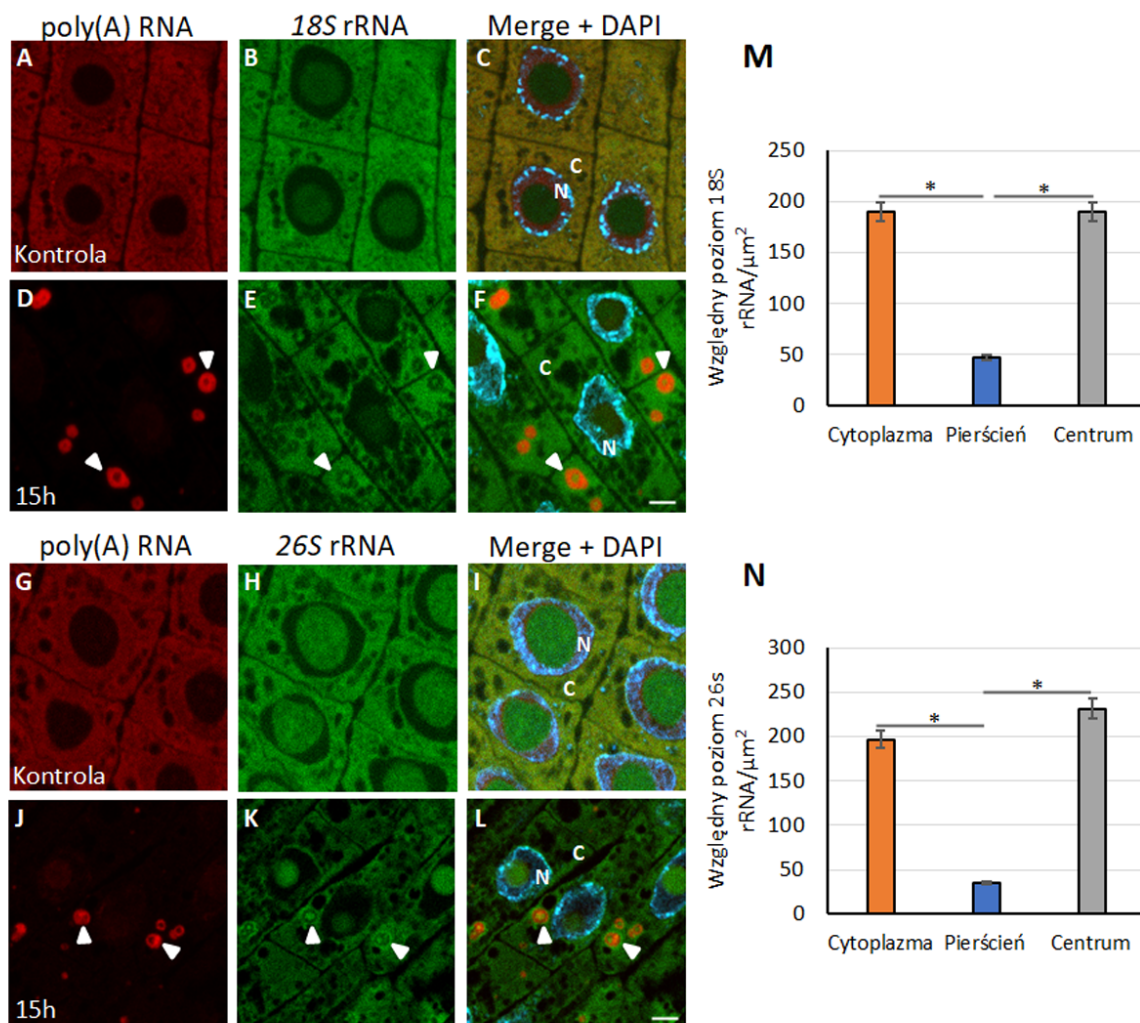
Powyższe techniki udokumentowały obecności poli(A) RNA i PAB2 głównie w pierścieniu SG, natomiast centralny obszar SG jest ubogi w badane molekuly. Ponadto analizy ultrastrukturalne ujawniły obecność w centralnej strefie SG wolnych rybosomów (Ryc. 5D). Struktura rybosomów w SG nie różniła się od tych znajdujących się w cytoplazmie. W celu potwierdzenia obecności rybosomów w strefie centralnej SG przeprowadzono hybrydyzację *in situ* do 18S i 26S rRNA, występujących odpowiednio w małej i dużej podjednostce rybosomu, oraz dokonano analiz ilościowych uzyskanych wyników. W warunkach kontrolnych sygnał obu sond przejawiał dość silny dyfuzyjny charakter w obrębie jąderka i cytoplazmy (Ryc. 6A-C, 6G-I). W trakcie hipoksji, wysoki poziom fluorescencji, zarówno 18S, jak i 26S rRNA zaobserwowano dodatkowo w strefie centralnej SG, podczas gdy pierścień charakteryzował się istotnie niższą intensywnością znakowania (Ryc. 6D-F, 6J-L). Co ciekawe poziom sygnału w centrum granul stresowych był zbliżony do poziomu fluorescencji z terenu cytoplazmy, a w przypadku 26S rRNA był on-wyższy (Ryc. 6M-N). Interesujący jest również fakt, iż w pobliżu granul stresowych obserwowana była akumulacja sygnału sondy do 26S rRNA (Ryc. 6J-L). Powyższe obserwacje wskazują, że centralna część SG jest podobna do okalającej te struktury cytoplazmy. Obecność 18S i 26S rRNA oraz obserwacje ultrastrukturalne potwierdzają obecność rybosomów w części centralnej granul stresowych.



Ryc. 4 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C) i hipoksji (6h, 15 h; D-I). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I). Groty strzałek – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m. Analiza STORM granul stresowych na półcienkich skrawkach korzeni *L. angustifolius* (J). Kropki reprezentują pojedyncze cząsteczki poli(A) RNA. Kropki oznaczone są kolorami według głębokości przekroju optycznego. Rozmiar kropki na obrazie jest ustawiony na 50 nm. Struktura SG na obrazie to izopowierzchnia klastra obliczona przez wykonanie analizy klastrowej na zestawie danych. Skala 600 nm. Immunolokalizacja PAB2 na wyizolowanej frakcji SGs (K-O). Powiększenie poszczególnych SGs (L-O). Groty – granule stresowe, R – pierścień SGs, Cn – obszar centralny SGs. Skala 5 μ m.



Ryc. 5 Analiza ultrastrukturalna: komórki merystematycznej korzenia *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A), dwustrefowych SGs (B, D). Immunozłotowa lokalizacja PAB2 w komórkach merystematycznych korzeni *L. angustifolius* w warunkach niedotlenienia (1h) (C). Skala 1 μ m. m – mitochondrium, v – wakuola, n – jądro komórkowe, er – retikulum endoplazmatyczne, r – pierścień SGs, cn – obszar centralny SGs, SG – granula stresowa, groty – rybosomy.



Ryc. 6 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i 18S (A-F), 26S (G-L) rRNA (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich merystematycznych korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C, G-I) i 15 h hipoksji (D-F, J-L). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L). Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm . Względny poziom fluorescencji 18S (M) i 26S (N) rRNA podczas 15h hipoksji w cytoplazmie oraz w dwóch strefach SGs: pierścieniu i obszarze centralnym. Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).

5.4 ROLA GRANUL STRESOWYCH W OKRESIE POWROTU DO WARUNKÓW FIZJOLOGICZNYCH

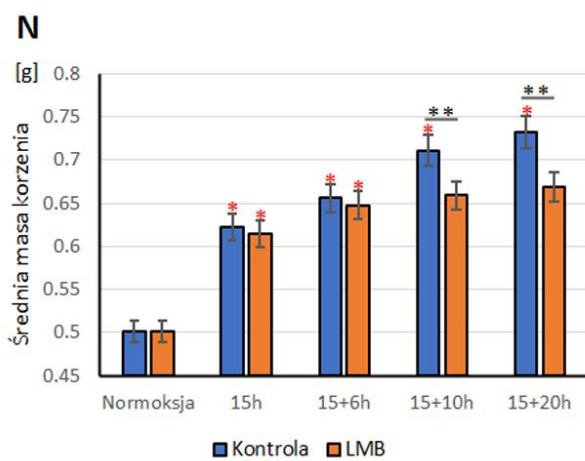
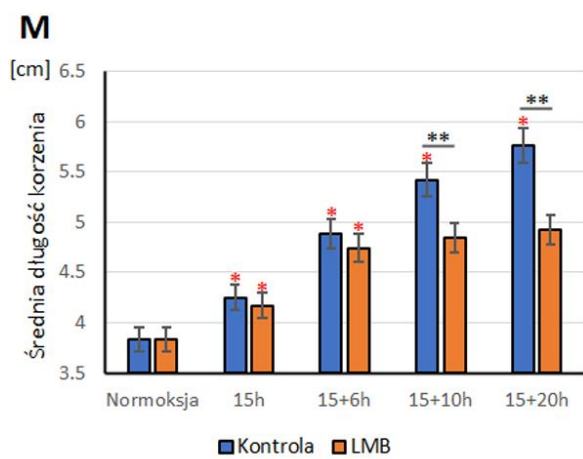
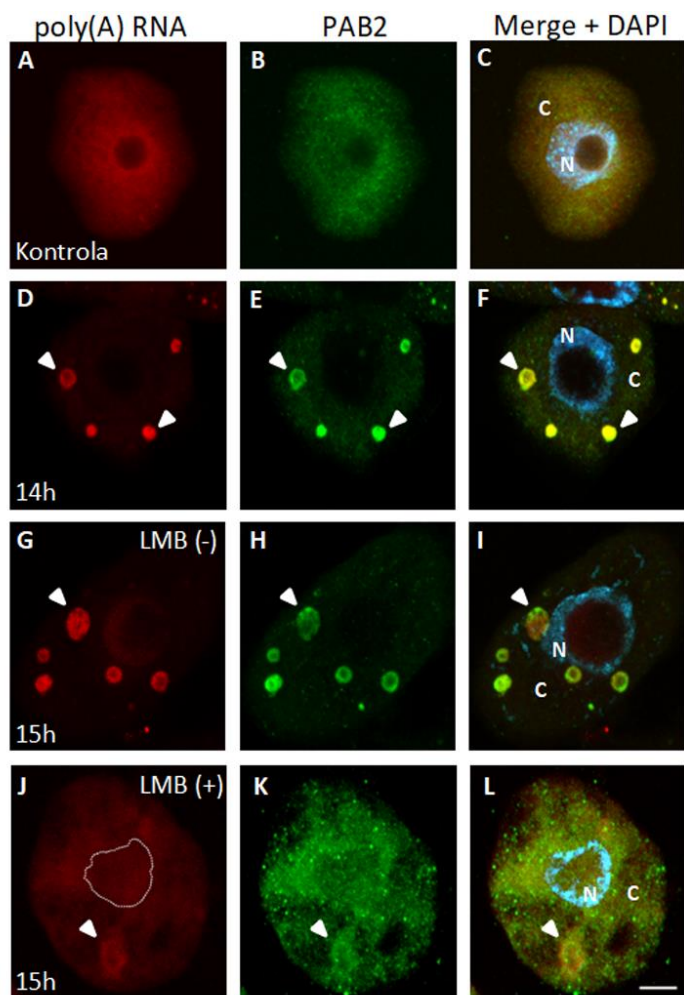
Dotychczas nie wyjaśniono w pełni roli cytoplazmatycznych granul stresowych w odpowiedzi na stres u roślin, dlatego też sprawdzono, czy zmagazynowane w SG poli(A) RNA jest wystarczające dla komórki podczas pierwszych etapów regeneracji po ustąpieniu niekorzystnych warunków. W tym celu korzenie łubinu poddane stresowi niedotlenienia

traktowano leptomycyną B – inhibitorem transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, w celu wyłączenia wpływu transkrypcji jądrowej na rekonwalescencję roślin po hipoksji a następnie analizowano zmianę dystrybucji mRNA w komórce oraz dynamikę przyrostu biomasy korzeniowej.

Kolokalizację poli(A) RNA i PAB2 przeprowadzono na korzeniach traktowanych i nie traktowanych leptomycyną B (LMB) (Ryc. 7A-L). W czternastej godzinie niedotlenienia, przed poddaniem działaniu inhibitora, potwierdzono w komórkach obecność SG (Ryc. 7D-F). Po godzinie od wprowadzenia leptomycyny B zaobserwowano natomiast zanik większości granul stresowych (Ryc. 7J-L). W cytoplazmie komórek widoczne były jedynie pojedyncze SG o słabej intensywności sygnału obu badanych molekuł. Zarówno poli(A) RNA jak i PAB2 wykazały homogenną dystrybucję na terenie jądra i cytoplazmy. Co ważne, intensywność sygnału w obu tych obszarach była wyższa w porównaniu do komórek przed zastosowaniem inhibitora (Ryc. 7G-I). W wyniku zablokowanego eksportu doszło do uwolnienia mRNA z granul stresowych do cytoplazmy oraz nagromadzenia transkryptów w jądrze komórkowym. Uzyskany wynik wskazuje więc, że na skutek zastosowania inhibitora eksportu jądrowo - cytoplazmatycznego następuje zanik granul stresowych przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu poli(A) RNA na terenie cytoplazmy, a także akumulacji w jądrze komórkowym.

W kolejnym etapie tej części badań przeanalizowano zmiany długości i masy korzeni łubinu podczas hipoksji oraz w kolejnych godzinach reoksygenacji przy jednoczesnym działaniu leptomycyny B. W trakcie stresu niedotlenienia wzrost badanych parametrów, w porównaniu do warunków fizjologicznych, odnotowano zarówno w grupie kontrolnej, jak i traktowanej inhibitorem (Ryc. 7M-N). Tendencję wzrostową długości i masy korzeni zaobserwowano również po sześciu godzinach reoksygenacji, przy czym niewielka różnica pomiędzy grupami nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Co interesujące, w kolejnych dziesięciu i dwudziestu godzinach reoksygenacji korzenie grupy kontrolnej wykazały proporcjonalny do czasu trwania eksperymentu przyrost biomasy, podczas gdy w grupie poddanej działaniu leptomycyny B nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w długości i masie korzeni.

Powyższe obserwacje oraz wyniki opisanych wcześniej analiz mikroskopowych wskazujących na silny wzrost poziomu cytoplazmatycznej puli poli(A) RNA, przy jednoczesnym zatrzymaniu transportu transkryptów z jądra komórkowego w czasie reoksygenacji, wskazują, iż w pierwszych godzinach po przywróceniu warunków fizjologicznych granule stresowe stanowią główne źródło poli(A) RNA w komórce.



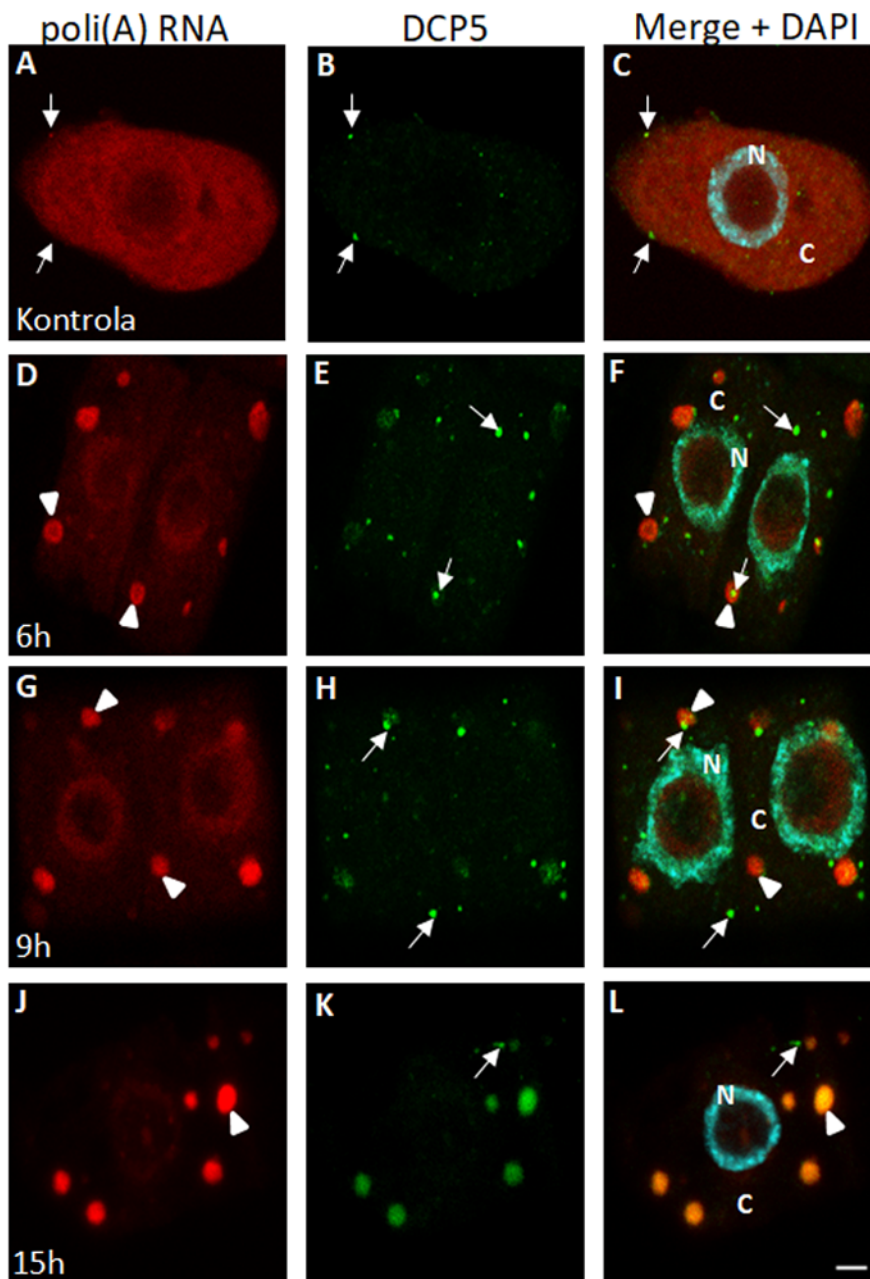
Ryc. 7 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) w protoplastach komórek merystematycznych korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C), 14h hipoksji przed dodaniem leptomycyny B (D-F), 15h hipoksji bez leptomycyny B (G-I), 15h hipoksji po dodaniu leptomycyny B (J-L). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L). Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma, przerywana linia wyznacza obszar jądra komórkowego. Skala 5 μ m. Średnia masa (M) i długość korzeni (N) próby kontrolnej oraz poddanej działaniu leptomycyny B (przez ostatnią, 15. godzinę hipoksji oraz w trakcie kolejnych godzin reoksygenacji) w warunkach fizjologicznych (Normoksja), niedotlenienia (15h) oraz ponownego natlenienia (15+6h, 15+10h, 15+20h). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotnie statystycznie różnice wskazuje symbol: (*) pomiędzy oznaczonymi porównaniami, (*) w porównaniu do poprzedniego stadium (**/** $P < 0,01$, */* $P < 0,05$).

5.5 PRZESTRZENNE I STRUKTURALNE POWIĄZANIA SG Z CIAŁAMI P

W kolejnym etapie zbadano, czy granule stresowe są przestrzennie lub funkcjonalnie powiązane z innymi dotychczas poznanymi strukturami cytoplazmatycznymi, zaangażowanymi w metabolizm RNA, zarówno podczas warunków fizjologicznych, jak i stresu – ciałami P. Przeprowadzono reakcję podwójnego znakowania sondą komplementarną do poli(A) RNA oraz przeciwciałem skierowanym przeciwko DCP5 (z ang. Decapping 5-like protein), stanowiącym białko znacznikowe ciał P (Jang i wsp., 2019).

W warunkach kontrolnych sygnał DCP5 tworzył niewielkich rozmiarów struktury w cytoplazmie (Ryc. 8B). Sygnał poli(A) RNA zazwyczaj kolokalizował z białkiem markerowym ciał P (Ryc. 8A-C). Podczas sześciogodzinnej hipoksji, zwiększała się natomiast akumulacja sygnału DCP5 w ciałach P, których rozmiar i liczba wzrosły (Ryc. 8E). Niektóre z ciał P zlokalizowane były na peryferiach SG (Ryc. 8D-F). Niekiedy w obrębie granul stresowych widoczny był homogenny sygnał DCP5 o niewielkim natężeniu kolokalizujący z poli(A) RNA. W trakcie kolejnych dziewięciu godzin niedotlenienia, wzrastała intensywność sygnału DCP5 w granulach stresowych (Ryc. 8G-I). W tym okresie ciała P w większości pozostawały w bliskim kontakcie z SG. Interesujące, że podczas piętnastogodzinnej hipoksji, większość sygnału cytoplazmatycznego DCP5 występowała homogenicznie, w ścisłej kolokalizacji z SGs (Ryc. 8J-L). Jedynie w peryferyjnej strefie cytoplazmy, widoczne były pojedyncze skupiska sygnału DCP5.

Powyższe wyniki wskazują, na odrębność ciał P i SG w warunkach fizjologicznych oraz podczas pierwszych etapów stresu hipoksji. Wraz z kolejnymi godzinami niedotlenienia w granulach stresowych zwiększała się akumulacja białka DCP5, której towarzyszy zanik ciał P w cytoplazmie. Świadczy to o przestrzennym i możliwym funkcjonalnym powiązaniu SG z ciałami P w trakcie stresu hipoksji w korzeniach *L. angustifolius*.



Ryc. 8 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i białka znacznikowego ciał P DCP5 (zielona fluorescencja) w protoplastach komórek merystematycznych korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C) i hipoksji (6h, 9h, 15h; D-L). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L). Groty – granule stresowe, strzałki – ciała P, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m

5.6 ZMIANY TRANSKRYPTOMICZNE W KORZENIACH *L. ANGUSTIFOLIUS* W ODPOWIEDZI NA STRES NIEDOTLENIANIA

Aby zbadać transkryptomiczną odpowiedź na indukcję i zakończenie stresu niedotlenienia w korzeniach *L. angustifolius*, porównano ekspresję genów w warunkach fizjologicznych, piętnastogodzinnej godzinnej hipoksji oraz sześciogodzinnego ponownego natlenienia. W tym celu wyizolowano z korzeni poli(A) RNA i przygotowano biblioteki cDNA, które następnie sekwencjonowano metodą RNA-Seq.

Ze względu na to, że *L. angustifolius* nie jest rośliną modelową, dostępne dane genomowe oraz transkryptomiczne charakteryzują się niekompletnymi adnotacjami i ograniczonymi informacjami dotyczącymi poznanych genów i izoform splicingowych. W związku z tym przeprowadzono *de novo* złożenie transkryptomu, co umożliwiło uzyskanie bardziej precyzyjnych danych, odzwierciedlających zmiany w korzeniu oraz warunki prowadzenia eksperymentu. W celu identyfikacji adnotowanych dotychczas transkryptów uzyskany transkryptom porównano z transkryptomem referencyjnym LupAngTanjil_v1.0.55, dostępnym w bazie ENSEMBL Plants (Yates i in., 2022). U *L. angustifolius* zidentyfikowano 66 097 transkryptów reprezentujących 35 811 genów, z czego 91% odpowiadało znanym transkryptom lub ich nowym izoformom splicingowym. Dodatkowo odkryto 911 nowych transkryptów antysensownych oraz 1 938 transkryptów ekspresyjnych z wcześniej nieopisywanych loci, z których wiele prawdopodobnie stanowi długie niekodujące RNA (lncRNA).

Następnie w celu określenia stopnia zróżnicowania wzorca ekspresji genów między próbkami, a także pomiędzy powtórzeniami biologicznymi, przeprowadzono analizę głównych składowych (z ang. principal component analysis, PCA) oraz grupowanie hierarchiczne genów na podstawie danych RNA-Seq. Analiza PCA wykazała wyraźne, oddalone od siebie klastry dla każdej z grup, co wskazuje, że warunki fizjologiczne, hipoksji i reoksygenacji charakteryzowały się wysoce zróżnicowanymi wzorcami ekspresji genów (Ryc. 9A) a powtórzenia biologiczne są spójne w obrębie badanych warunków. Wyniki wskazują zatem na wysoką wiarygodność uzyskanych danych. Hierarchiczne grupowanie genów na podstawie odległości euklidesowych między próbkami, również potwierdziło wysoką specyficzność odpowiedzi na zmienne warunki hodowli, w tym głównie na hipoksję. W próbach korzeni poddanych niedotlenieniu geny tworzyły odrębny klaster, wyraźnie oddzielony od klastrów genów zidentyfikowanych w próbach korzeni hodowanych w warunkach fizjologicznych i podczas reoksygenacji (Ryc. 9B). Geny w próbach po ponownym natlenieniu grupowały się

bliżej tych z prób korzeni rosnących w warunkach kontrolnych, co może wskazywać na znaczne przywrócenie profilu ekspresji genów po stresie hipoksji. Wyniki te wskazują, że warunki hipoksji i reoksygenacji indukują specyficzne zmiany w transkryptomie korzeni *L. angustifolius* i mogą odzwierciedlać dynamiczną odpowiedź komórek na stres i proces regeneracji. W kolejnym etapie, aby szczegółowo zbadać zmiany zachodzących na poziomie transkryptomu w stresie niedotlenienia korzeni łąbinu wykonano analizę różnicową eksprymowanych genów, obejmującą porównania pomiędzy hipoksją a kontrolą (Ryc. 9C), reoksygenacją a hipoksją (Ryc. 9D) oraz reoksygenacją a kontrolą (Ryc. 9E). We wszystkich tych porównaniach zaobserwowano zbliżoną liczbę genów o zwiększonej, jak i obniżonej ekspresji. Jednakże największą liczbę różnicowo eksprymowanych genów – 21036, odnotowano w porównaniu pomiędzy hipoksją a kontrolą, co wskazuje na silną odpowiedź komórek na warunki niedotlenienia. Wzrost poziomu ekspresji wykazano dla genów odpowiedzi na hipoksję (z ang. Hypoxia Responsive Genes, HRG), zidentyfikowanych uprzednio u *A. thaliana* (Mustroph i wsp., 2010). Wśród nich znalazły się *HUP7* (z ang. hypoxia-response unknown protein 7), *ADH1* (z ang. alcohol dehydrogenase 1), *PDC1* (z ang. pyruvate decarboxylase-1) i *HRA1* (z ang. hypoxia response attenuator 1), których krotność zmiany poziomu ekspresji wynosiła 5.8 – 8.9 (Ryc. 9C). Zwrócono także uwagę na zwiększoną ekspresję genów związanych z metabolizmem m⁶A, w tym genów kodujących białka kompleksu metylującego: *MTB* (z ang. methyltransferase B), *VIR* (z ang. virilizer), *HAKAI* (z ang. E3 ubiquitin-protein ligase), a także demetylazę *ALKBH9B*, podczas gdy jej bliski homolog, demetylaza *ALKBH9C* wykazała obniżony poziom ekspresji. Spośród genów, których ekspresja obniżyła się pod wpływem stresu, wyodrębniono grupę związaną z podstawowymi procesami metabolicznymi, do której należały: *L37* (z ang. 60S ribosomal protein L37), *L44* (z ang. 60S ribosomal protein L44) oraz *RPB1* (z ang. DNA-Directed RNA polymerase II Subunit RPB1). W przypadku porównania pomiędzy reoksygenacją a hipoksją, zaobserwowano natomiast odwrotną tendencję w ekspresji opisanych powyżej różnicowo eksprymowanych genów (Ryc. 9D). Z kolei analiza zmian transkryptomicznych dla porównania reoksygenacji z kontrolą wykazała, że geny HRG, mimo ustąpienia warunków stresowych, w dalszym ciągu ulegały ekspresji, lecz na niższym, niż w czasie hipoksji poziomie, z krotnością zmian mieszczącą się w zakresie 2,5 – 5 (Ryc. 9E). W porównaniu do warunków fizjologicznych, wyższym poziomem ekspresji charakteryzowały również się opisane wcześniej geny kodujące białka metylujące oraz demetylazy. Z kolei spośród analizowanych genów metabolizmu podstawowego, wyłącznie ekspresja *RPB1* była podwyższona w stosunku do warunków kontrolnych.

Następnie w celu zbadania procesów regulacyjnych zaangażowanych w odpowiedź na niedotlenienie i zidentyfikowania sekwencji kodujących wykonano adnotację funkcjonalną, czyli przypisanie funkcji potencjalnym produktom genów z zastosowaniem terminologii GO (z ang. Gene Ontology). Analizę GO przeprowadzono osobno dla genów o zwiększonym (Ryc. 10A, C, E) oraz obniżonym (Ryc. 10B, D, F) poziomie ekspresji we wszystkich badanych porównaniach. Ze względu na wysoką liczbę różnicowo ekspymowanych genów, podczas analizy uwzględniono jedynie 1000 genów nadreprezentowanych w porównaniach, tj. o najniższej wartości p oraz wykazujących co najmniej dwukrotną zmianę poziomu ekspresji.

W przypadku porównania pomiędzy hipoksją a kontrolą, geny ulegające zwiększonej ekspresji zostały podzielone na 14 kategorii GO (Ryc. 10A). Wśród nich, 6 głównych terminów związanych z odpowiedzią na stres dotyczyło: 1. aktywności kinaz serynowo-treoninowych, 2. regulacji ściany komórkowej w tym ksyloglukanów, 3. biosyntezy trehalozy, 4. metabolizmu sacharozy, 5. odpowiedzi na kwas abscysynowy oraz 6. aktywności oksydoreduktazy. W aspekcie genów, których ekspresja uległa obniżeniu w trakcie hipoksji większa część terminów GO dotyczyła metabolizmu komórkowego oraz funkcji organelli, w szczególności: 1. wiązania hemu, 2. proteolizy, 3. transportu międzybłonowego, 4. aktywności hydrolaz glikozydowych, 5. biosyntezy kwasów tłuszczowych (Ryc. 10B).

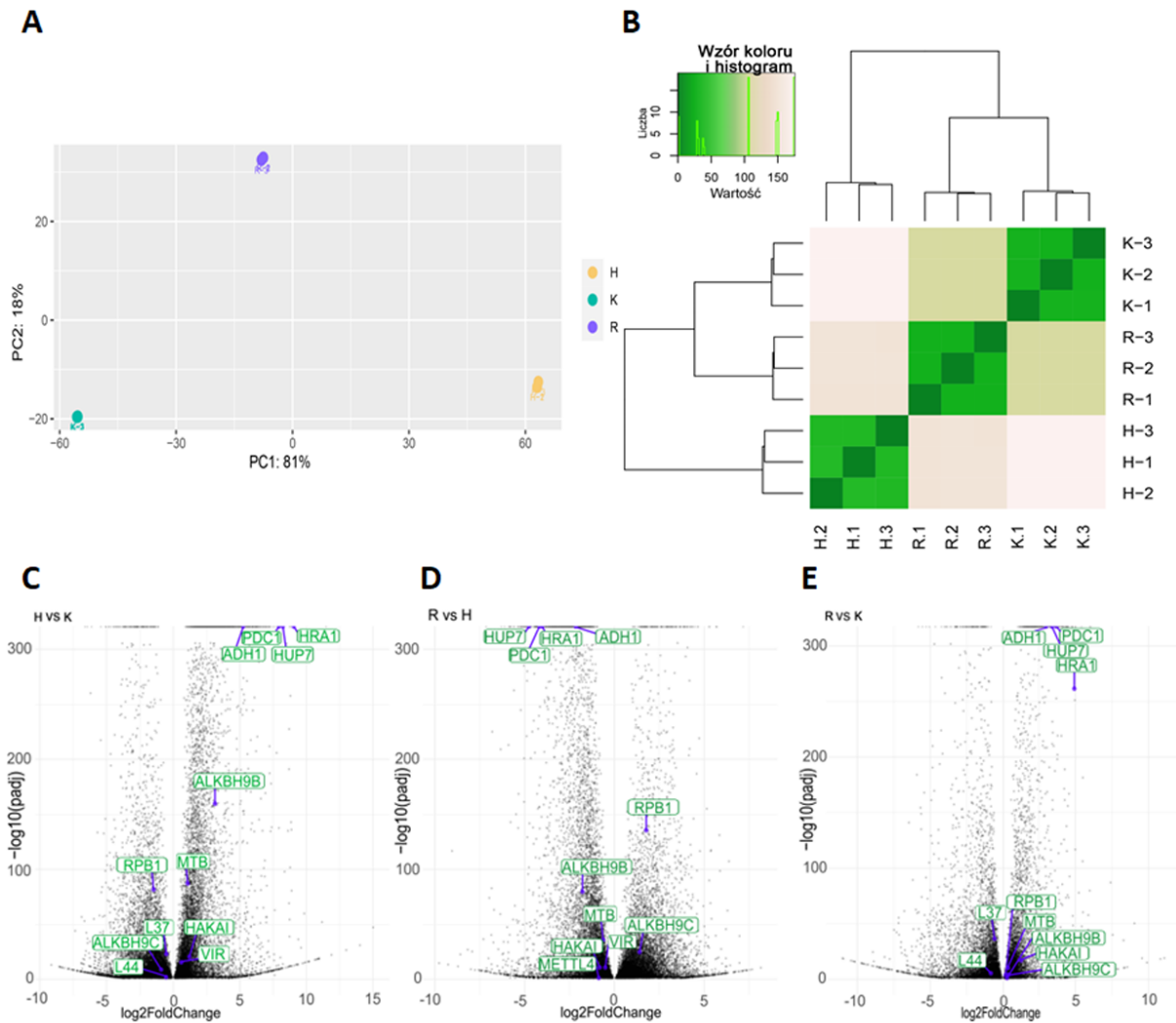
Analiza GO dla porównania reoksygenacji z hipoksją wykazała odwrotną tendencję dla większości sklasyfikowanych terminów, zarówno w przypadku genów o zwiększonym (Ryc. 10C), jak i obniżonym (Ryc. 10D) poziomie ekspresji, w porównaniu do zestawienia hipoksji z kontrolą. Dodatkowo w trakcie ponownego natlenienia silniejszej ekspresji ulegały geny, których funkcja związana jest przede wszystkim z aktywnością enzymatyczną, m.in. liaz i acylotransferaz.

Genom, których ekspresja zwiększyła się w zestawieniu reoksygenacji z kontrolą przypisano 25 kategorii (Ryc. 10E). Najwięcej genów przypisano do kategorii związanych z regulacją metabolizmu, regeneracją komórek oraz obroną przed stresem oksydacyjnym, do których należały m.in.: 1. wiązanie hemu, 2. wiązanie jonów żelaza, 3. aktywność oksydoreduktaz, 4. aktywność monooksygenazy, 5. reakcja obronna. Co ciekawe geny o obniżonej ekspresji w porównaniu do warunków kontrolnych zostały również zaklasyfikowane głównie do kategorii wiązania hemu, a także procesów związanych z: 1. proteolizą, 2. detoksyfikacją, 3. apoplastem 4. mikrotubulami oraz 5. biosyntezą kwasów tłuszczowych (Ryc. 10F). Uzyskane wyniki wskazują na wystąpienie intensywnych procesów regeneracyjnych po ustąpieniu warunków stresowych. W szczególności sposób we wszystkich porównaniach

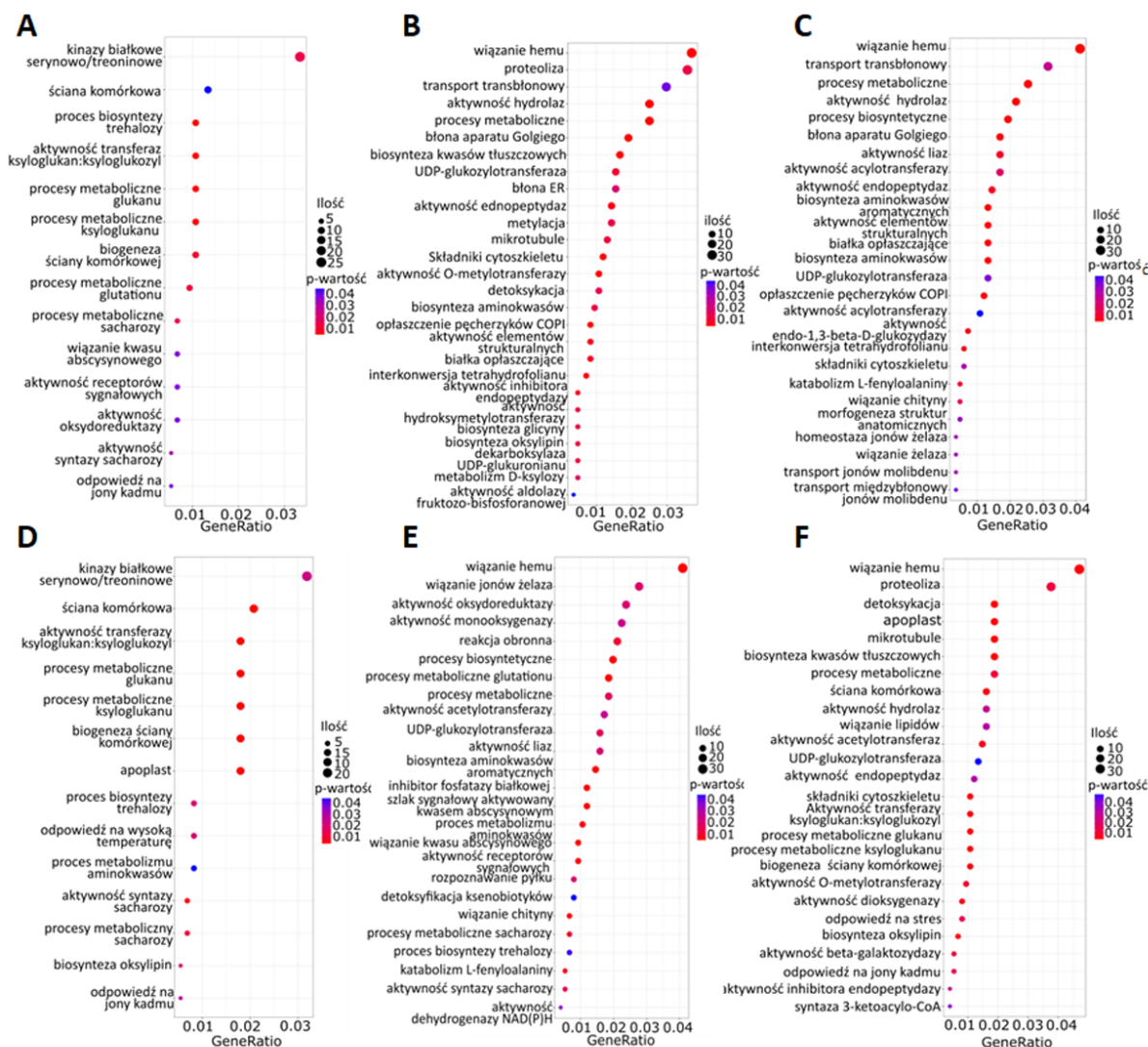
wyróżniają się terminy związane z biosyntezą składników i remodelowaniem ściany komórkowej.

W celu potwierdzenia uzyskanych wyników analiz transkryptomicznych w kolejnym etapie badań wybrano geny wykazujące istotne różnice poziomu ekspresji w odpowiedzi na zmienne warunki hodowli, by określić poziom ich transkryptów za pomocą reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR, RT-qPCR). Otrzymane wyniki normalizowano względem genu referencyjnego *UBC* (z ang. Ubiquitin C).

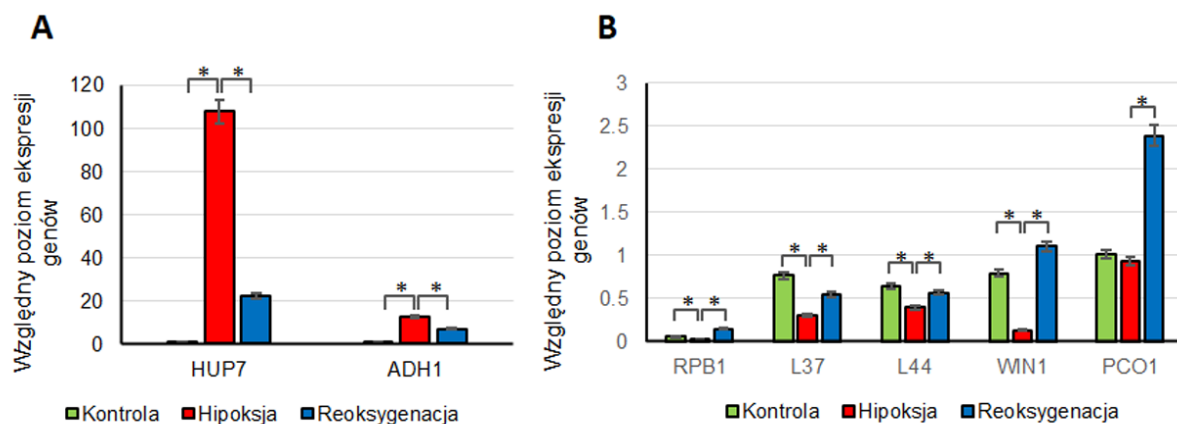
Spośród genów odpowiedzi na hipoksję, wcześniej zidentyfikowanych u *A. thaliana*, wybrano geny *WIN1* (z ang. Ethylene-responsive transcription factor WIN1), *PCOI* (z ang. plant cysteine oxidase 1), *HUP7* i *ADH1*. W przypadku *HUP7* i *ADH1* zaobserwowano znaczny (odpowiednio ponad 100 - i 12 - krotny) wzrost ilości transkryptów podczas niedotlenienia, natomiast powrót do warunków fizjologicznych skutkowało ich obniżeniem (Ryc. 11A). W przypadku poziomu ekspresji *PCOI* pozostał on niezmienny w trakcie stresu, a natomiast poziom *WIN1* uległ obniżeniu, wskazując, że geny te nie są zaangażowane w odpowiedź na niedotlenienie u *L. angustifolius* (Ryc. 11B). Z kolei dla wybranych genów metabolizmu podstawowego, tj. *RPB1*, *L37*, *L44* w warunkach hipoksji widoczny był spadek ilości mRNA, podczas gdy ich poziom zwiększał się po ponownym natlenieniu (Ryc. 11B). Jednakże tylko w przypadku *RPB1* ilość mRNA w czasie reoksygenacji była wyższa, od tej odnotowanej dla warunków kontrolnych. Powyższe wyniki są zatem zgodne z danymi RNA-Seq, co potwierdza wiarygodność przeprowadzonych analiz.



Ryc. 9 Analiza głównych składowych (PCA) danych RNA-Seq dla 3 powtórzeń biologicznych w oparciu o poziomy ekspresji genów, w korzeniach *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (C), hipoksji (H) i reoksygenacji (R) (A). Hierarchiczne grupowanie genów na podstawie macierzy odległości euklidesowej pomiędzy powtórzeniami biologicznymi powyższych prób (B). Wykres wulkaniczny genów różnicowo ekspresjonowanych dla porównań pomiędzy hipoksją a kontrolą (C), reoksygenacją a hipoksją (D), reoksygenacją a kontrolą (E). Oznaczone zostały geny: odpowiedzi na niedotlenienie (ADH1, HUP7, PDC1, HRA1), związane z regulacją m6A (metylaza m6A: MTB, Vir i HAKAI; demetylaza m6A: ALKBH9B, ALKBH9C) i metabolizmu podstawowego (L37, L44, RPB1).



Ryc. 10 Schemat punktowy przedstawiający nadreprezentację terminów analizy GO wśród genów których poziom ekspresji wzrastał (A, C, E) bądź zmniejszył się (B, D, F) w porównaniach pomiędzy hipoksją a kontrolą (A, B), reoksygenacją a hipoksją (C, D), reoksygenacją a kontrolą (E, F).



Ryc. 11 Względny poziom ekspresji genów odpowiedzi na niedotlenienie (A) i metabolizmu podstawowego (B) w warunkach fizjologicznych, hipoksji (15h) i reoksygenacji (15+6). Wyniki znormalizowano względem genu referencyjnego *UBC5*. Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).

5.7 LOKALIZACJA WYBRANYCH MRNA W KOMÓRKACH KORZENI *L. ANGUSTIFOLIUS* ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM GRANUL STRESOWYCH

Aby zbadać korelację między ilością transkryptów o znanym poziomie ekspresji a ich lokalizacją komórkową, przeprowadzono hybrydyzację *in situ* wraz z jednoczesną detekcją granul stresowych. Następnie uzyskany sygnał fluorescencyjny poddano analizom ilościowym.

Na początku określono lokalizację komórkową transkryptu *ADHI* (gen markerowy hipoksji) (Ryc. 12A-S). W warunkach kontrolnych oraz w ciągu pierwszych sześciu godzin niedotlenienia sygnał mRNA *ADHI* był niski, homogenicznie rozmieszczony w cytoplazmie, a jego intensywność wzrastała wraz z czasem trwania stresu (Ryc. 12A-F, T). W ciągu kolejnych dziewięciu godzin niedotlenienia obserwowano wyraźny wzrost poziomu sygnału w cytoplazmie (Fig. 12J-L, T). W granulach stresowych zaobserwowano znikomy poziom sygnału *ADHI* o niejednorodnej dystrybucji, który występował głównie w strefie centralnej, podczas gdy pierścień SG pozostawał wolny od fluorescencji. Podobny wzorec rozkładu sygnału w SG oraz wzrost jego intensywności w cytoplazmie obserwowano po piętnastu godzinach niedotlenienia (Ryc. 12M-O, T). Z kolei po powrocie do optymalnych warunków tlenowych poziom fluorescencji *ADHI* znacząco się obniżał (Ryc. 12P-S, T). Analiza ilościowa fluorescencji *ADHI* wykazała, że w trakcie stresu pierścień SG charakteryzował się ponad czterokrotnie niższą intensywnością sygnału w porównaniu do cytoplazmy i strefy centralnej SG (Ryc. 12T). Poziom fluorescencji w pierścieniu był zbliżony do wartości odnotowanej dla cytoplazmy w warunkach kontrolnych, co świadczy o jego znikomej ilości. Z kolei w centralnej

części SG fluorescencja była odpowiednio 15% i 25% procent niższa, niż w cytoplazmie w trakcie dziewięciu i piętnastu godzin niedotlenienia. Warto zaznaczyć, że dystrybucja transkryptu *ADHI* w SG była podobna do wzorca obserwowanego dla rRNA.

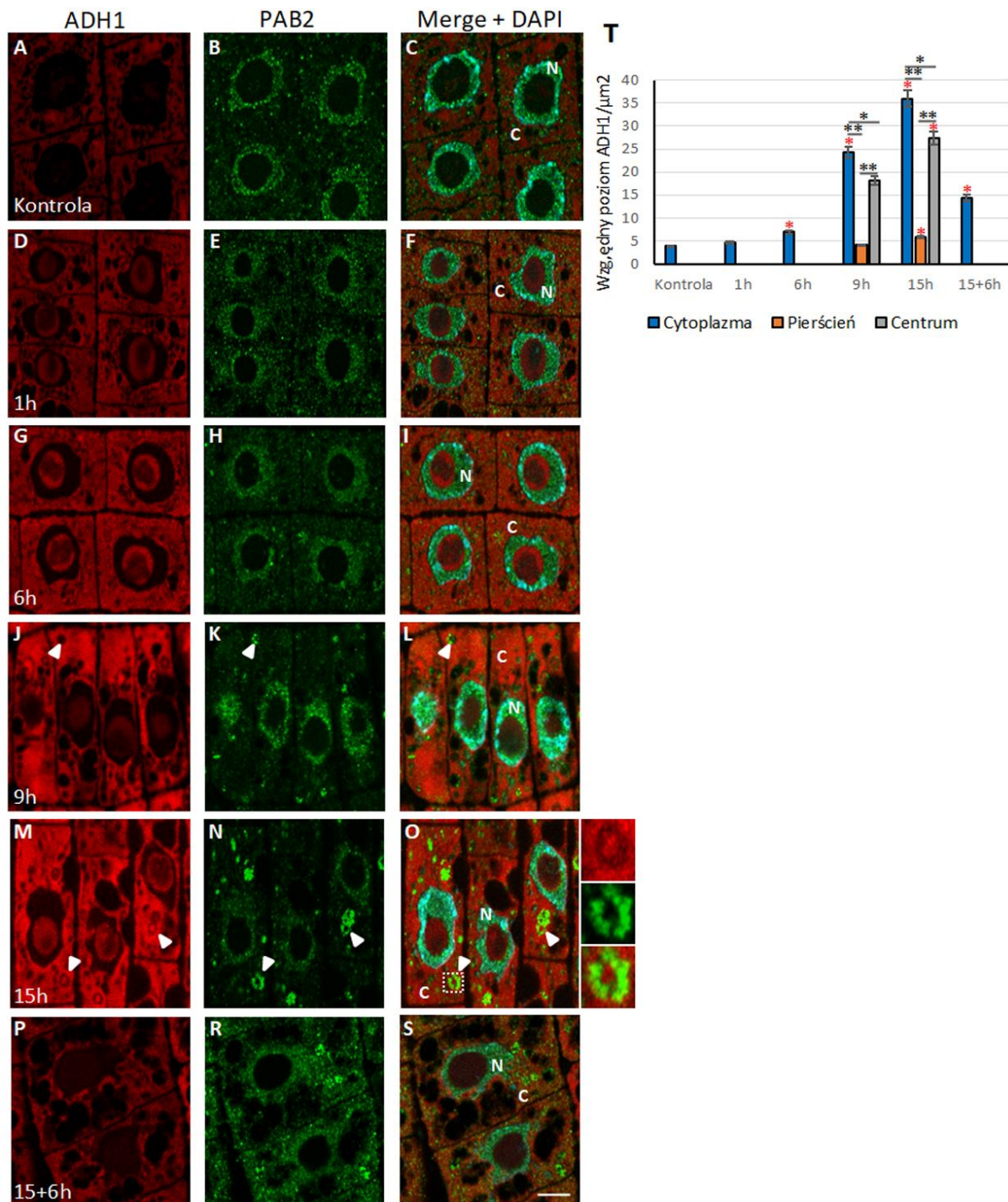
Kolejnym genem odpowiedzi na stres, którego lokalizację mRNA zbadano, był *HUP7*. W warunkach kontrolnych, sygnał fluorescencji o niskiej intensywności był obecny w cytoplazmie (Ryc. 13A-I). Z kolei po piętnastu godzinach hipoksji, poza wyraźnym wzrostem intensywności sygnału, zaobserwowano również akumulację fluorescencji w granulach stresowych (Ryc. 13G-I). W przeciwieństwie do transkryptu *ADHI*, mRNA *HUP7* w obrębie SG był dystrybuowany jednolicie. Analiza poziomu fluorescencji *HUP7* w obu strefach SG, wyznaczonych na podstawie rozmieszczenia poli(A) RNA, nie wykazała różnic między pierścieniem a strefą centralną (Ryc. 13J). Intensywność sygnału wykrywanego transkryptu *HUP7* w SG była czterokrotnie wyższa, niż w cytoplazmie. *HUP7* należy zatem do genów odpowiedzi na hipoksję, którego poziom mRNA w komórkach łubinu jest wyższy niż transkryptu *ADHI*.

Analogiczną analizę przeprowadzono również dla mRNA genów metabolizmu podstawowego. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem sondy komplementarnej do fragmentu środkowej sekwencji transkryptu *RPBI*, wykazały wysoki poziom homogenego sygnału na terenie cytoplazmy w warunkach kontrolnych oraz podczas pierwszej godziny niedotlenienia (Ryc. 14A-F, T). Fluorescencja sondy była widoczna w granulach stresowych po sześciu godzinach stresu (Ryc. 14G-I). W tym przypadku sygnał *RPBI* był w ich obrębie rozmieszczony homogenicznie. Podobny rozkład sygnału zaobserwowano podczas kolejnych dziewięciu i piętnastu godzin niedotlenienia, przy czym stosunek ilości mRNA *RPBI* między SG a cytoplazmą wzrastał wraz z długością czasu trwania stresu (Ryc. 14J-O, T). W piętnastej godzinie hipoksji poziom sygnału w SG był prawie dwukrotnie wyższy, niż w cytoplazmie, co wskazuje, że spadek poziomu mRNA w cytoplazmie korelował z jego akumulacją w SG. Podczas reoksygenacji rozproszeniu granul stresowych towarzyszył silny wzrost intensywności sygnału fluorescencji w cytoplazmie, osiągając wartość wyższą niż w warunkach kontrolnych (Ryc. 14P-S, T). Uzyskane wyniki wykazały obniżenie poziomu transkryptu *RPBI* w kolejnych godzinach niedotlenienia oraz silny wzrost po ustąpieniu warunków stresowych, co potwierdza dane uzyskane techniką RNA-Seq i RT-qPCR.

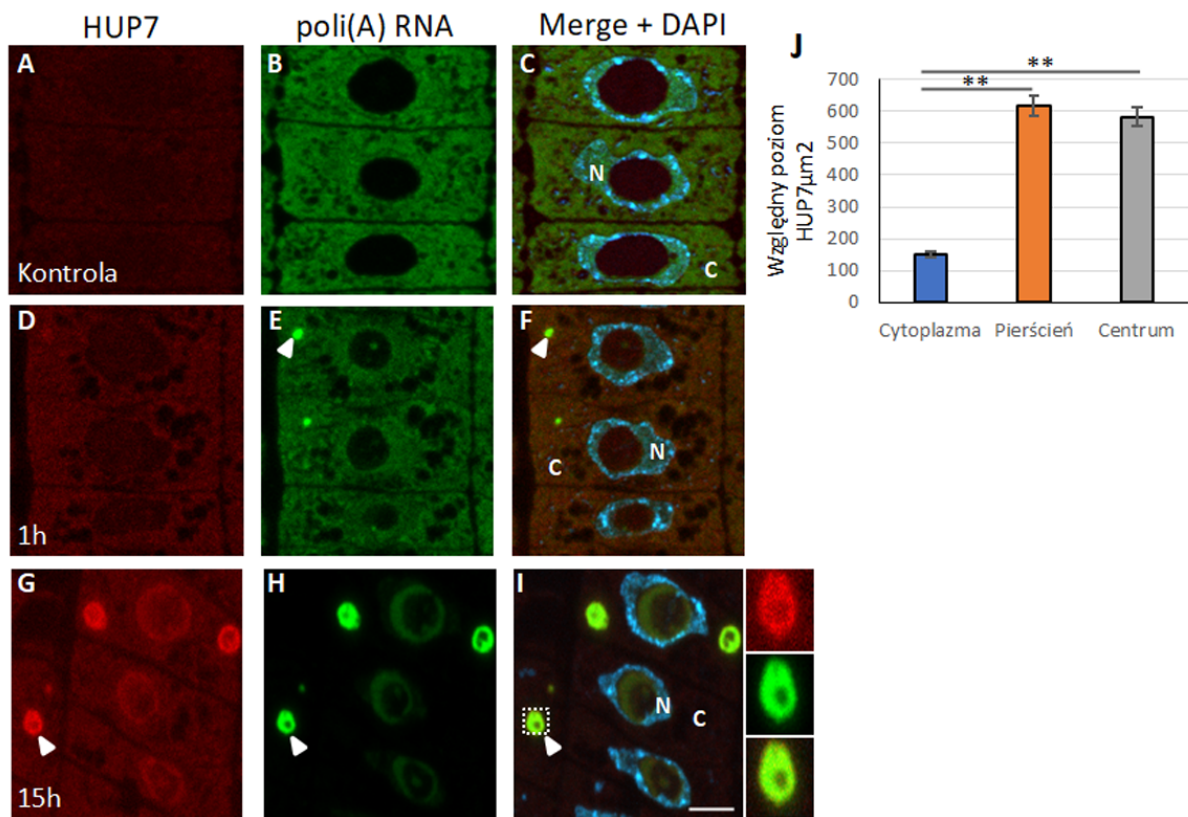
Dla genów metabolizmu podstawowego, *L37* i *L44*, zarówno zmiany poziomów transkryptów, jak i ich dystrybucja w cytoplazmie oraz w SG przypominały te opisane dla mRNA *RPBI* (Ryc. 15A-J, 16A-J). Dlatego w pracy przedstawiono obrazy mikroskopowe i pomiary ilościowe tylko dla komórek korzeni łubinu hodowanego w warunkach kontrolnych,

piętnastogodzinnej hipoksji oraz po ponownym ich natlenieniu. Jedyną odnotowaną różnicą dla analizowanych wariantów był poziom sygnału cytoplazmatycznego podczas reoksygenacji. Dla mRNA *L37* był on taki sam, jak w warunkach kontrolnych (Ryc. 15J), natomiast dla transkryptu *L44* (Ryc. 16J) był on o 13% niższy. Podobnie w przypadku mRNA genów *WIN1* i *PCO1*, których poziom odpowiednio spada lub pozostaje niezmienny w odpowiedzi na stres niedotlenienia, sygnał wskazujący na obecność transkryptu akumulował w SG i był rozmieszczony homogennie, bez wyraźnego podziału na pierścień i część centralną (Ryc. 17A-L).

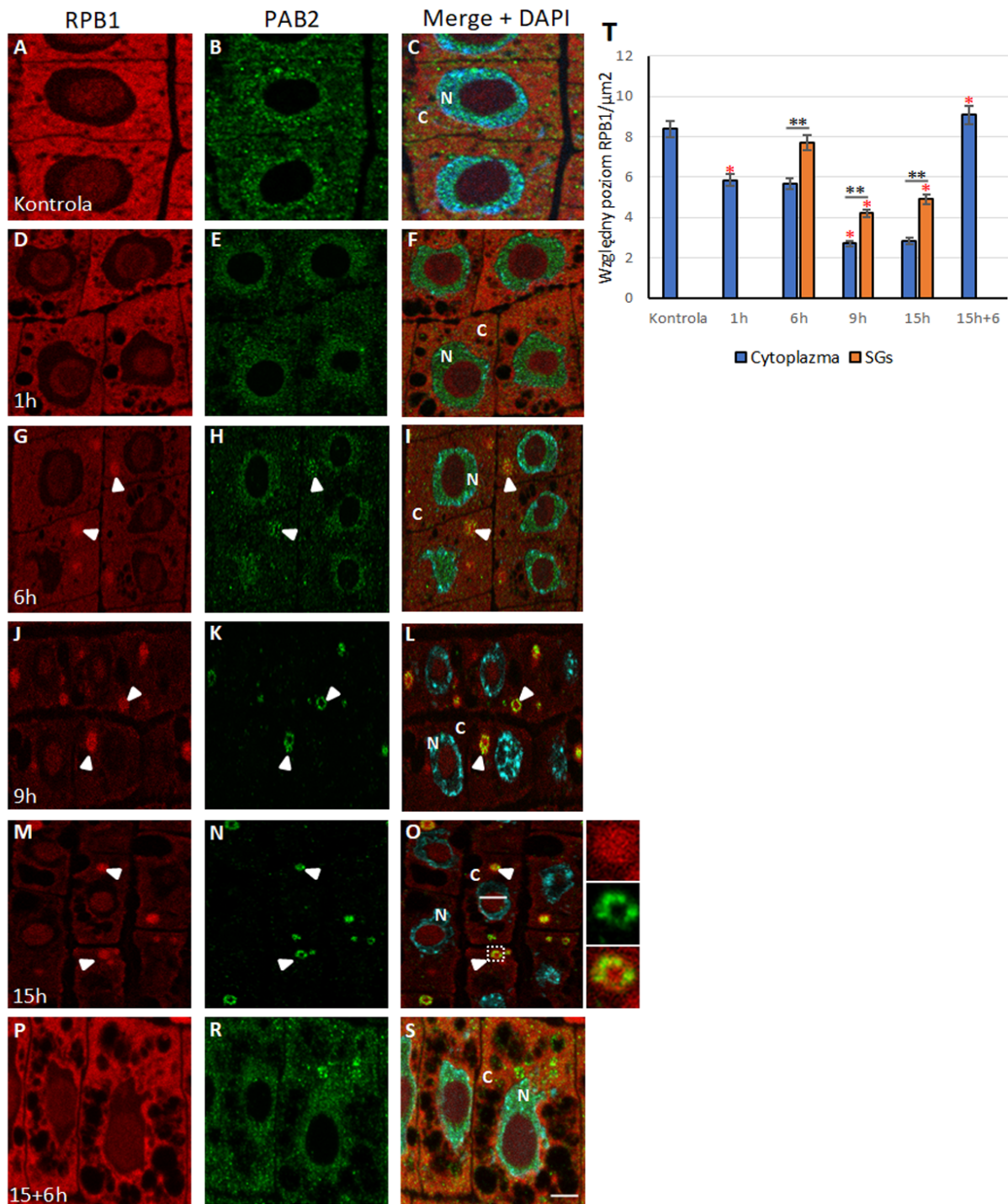
Sondy stosowane dla lokalizowanych transkryptów były komplementarne do środkowych fragmentów mRNA. Aby określić, czy rozkład fragmentów sekwencji mRNA jest jednolity w obrębie SG podjęto próbę detekcji ich sekwencji 5' UTR. Okazało się, że większość generowanych sond do końca 5' mRNA nie daje pozytywnych sygnałów reakcji FISH. Udało się to natomiast dla transkryptów *RPB1* i *HUP7* podczas piętnastogodzinnej hipoksji. Co ciekawe, w obu przypadkach uzyskano inny rozkład sygnału, niż przy zastosowaniu sondy rozpoznającej środkowy fragment mRNA (Ryc. 18A-F). Fluorescencja sondy do 5' UTR *RPB1* była obecna wyłącznie w pierścieniu SG, przypominając dystrybucję poli(A) RNA w tych strukturach (Ryc. 18A-C). Również w przypadku sondy 5' UTR *HUP7* sygnał fluorescencji występował w pierścieniu, podczas gdy sonda skierowana do środkowej sekwencji kodującej była rozmieszczona bardziej równomiernie w obrębie SG (Ryc. 18D-F). Uzyskane wzorce lokalizacji wskazują na różne pozycjonowanie końca 5' i środka mRNA w obrębie granul stresowych. Końce 5' mRNA występowały w pierścieniu SG, natomiast centralna część transkryptów była zlokalizowana równomiernie w całych strukturach i silnie obejmowała ich strefę centralną.



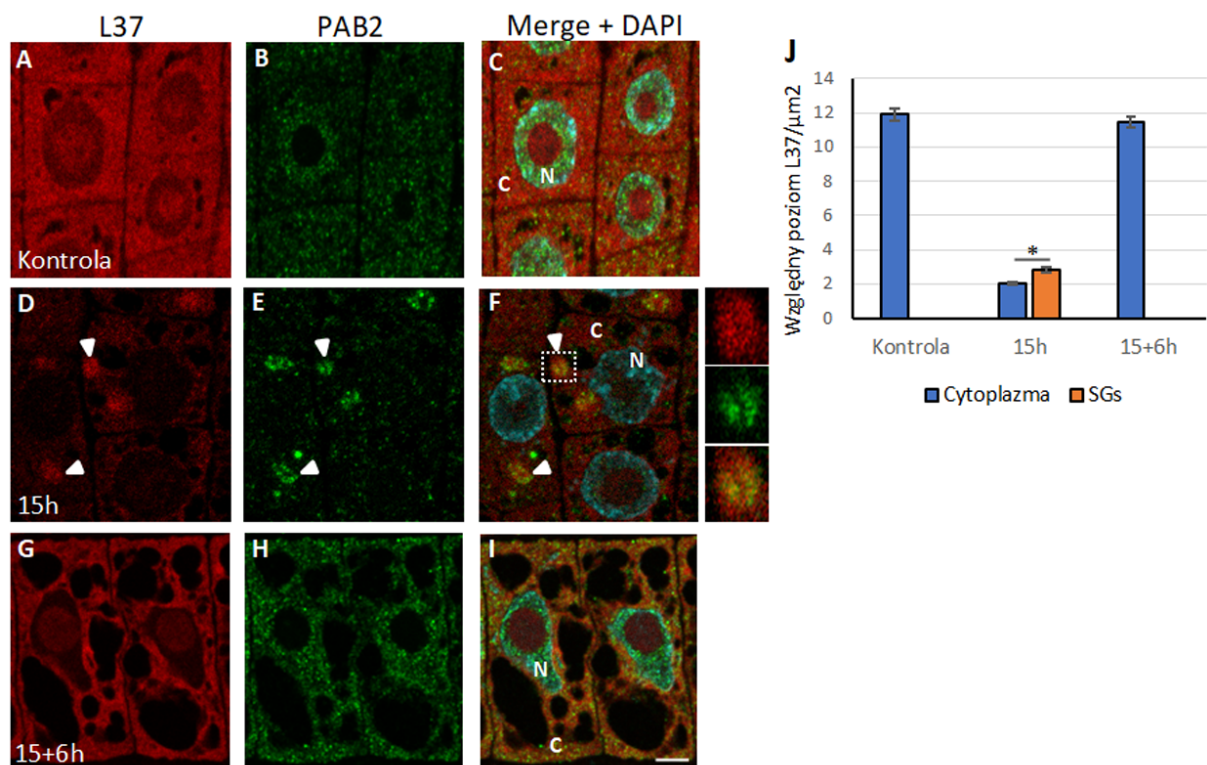
Ryc. 12 Lokalizacja ADH1 (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C), hipoksji (1h, 6h, 9h, 15h; D-O) i reoksygenacji (15+6h; P-S). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L, O, S). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm. Względny poziom fluorescencji ADH1 (T) w warunkach fizjologicznych (kontrola) i kolejnych godzin niedotlenienia (1h, 6h, 9h, 15 h) w cytoplazmie oraz w dwóch strefach SGs: pierścieniu i obszarze centralnym. Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotnie statystycznie różnice wskazuje symbol: (*) pomiędzy oznaczonymi porównaniami, (*) w porównaniu do poprzedniego stadium (**/** $P < 0,01$, */* $P < 0,05$).



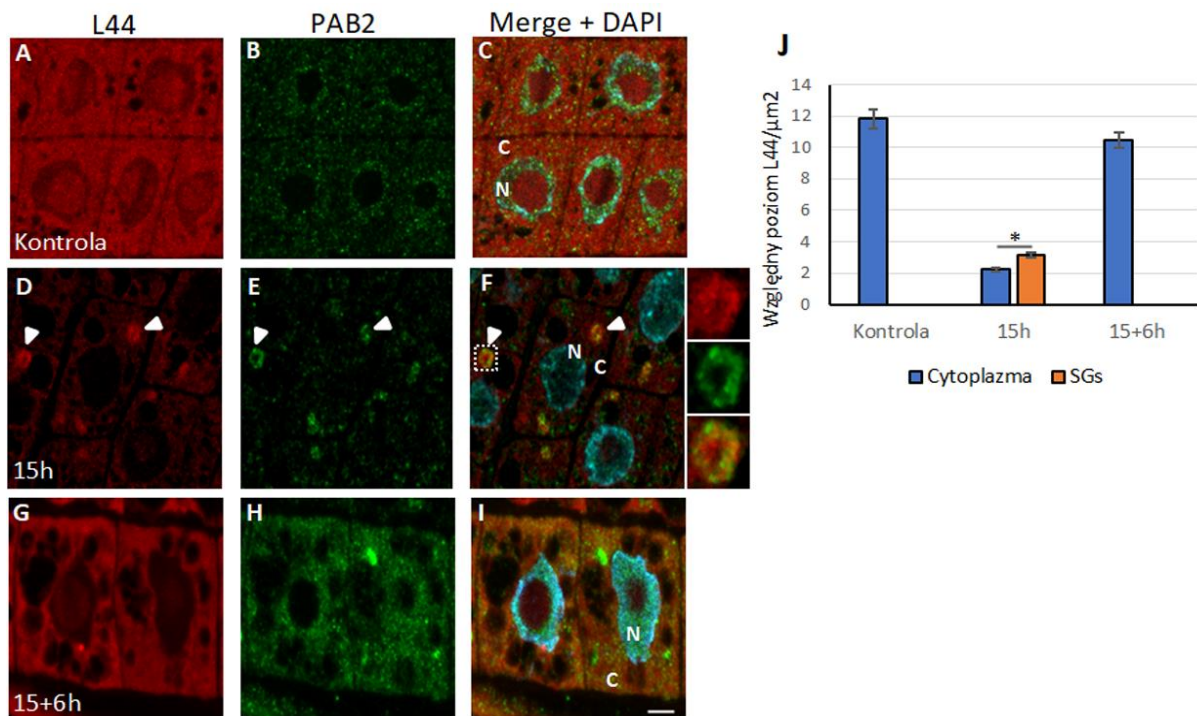
Ryc. 13 Lokalizacja HUP7 (czerwona fluorescencja) i poli(A) RNA (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C) i hipoksji (1h, 15h; D-I). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m. Względny poziom fluorescencji HUP7 podczas 15h hipoksji w cytoplazmie oraz w dwóch strefach SGs: pierścieniu i obszarze centralnym (J). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).



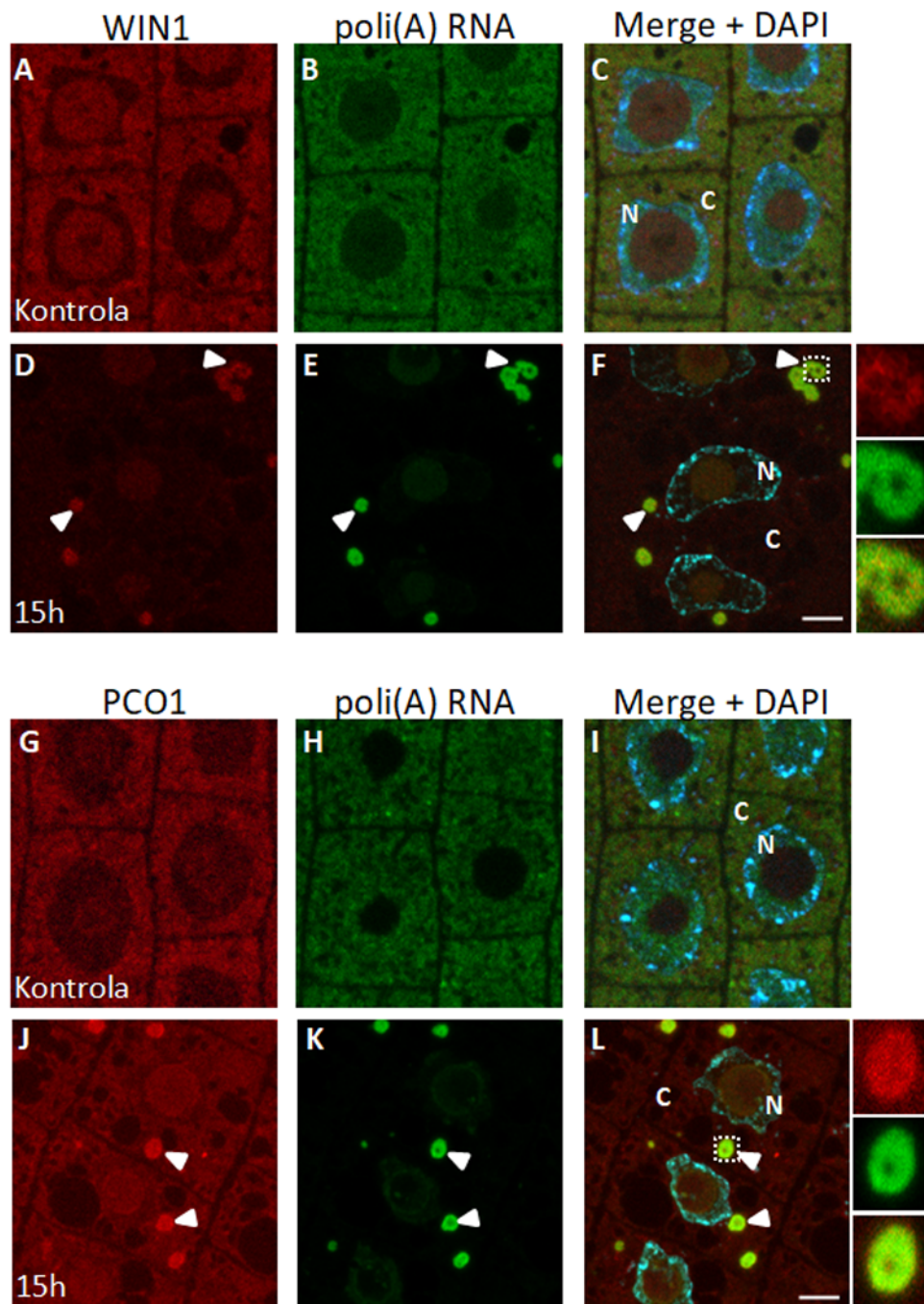
Ryc. 14 Lokalizacja RPB1 (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C), hipoksji (1h, 6h, 9h, 15h; D-O) i reoksygenacji (15+6h; P-S). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L, O, S). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm. Względny poziom fluorescencji RPB1 (T) w warunkach fizjologicznych (kontrola) i kolejnych godzin niedotlenienia (1h, 6h, 9h, 15 h) w cytoplazmie oraz w dwóch strefach SGs: pierścieniu i obszarze centralnym. Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice wskazuje symbol: (*) pomiędzy oznaczonymi porównaniami, (*) w porównaniu do poprzedniego stadium (**/** $P < 0,01$, */* $P < 0,05$).



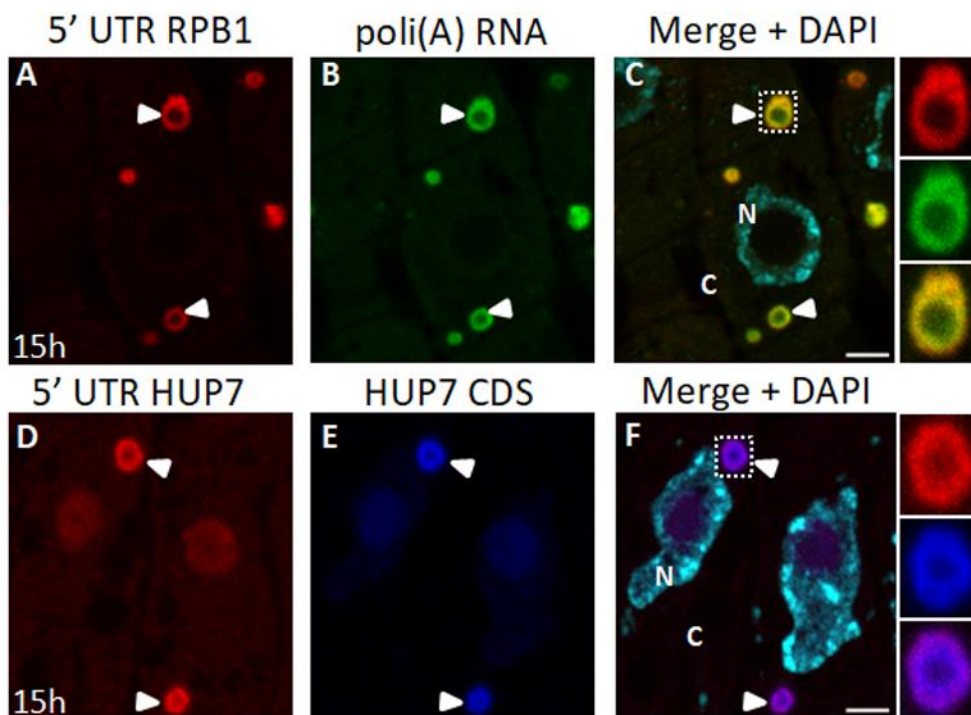
Ryc. 15 Lokalizacja L37 (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C) i hipoksji (15h; D-I) i reoksygenacji (15+6, G-I). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm. Względny poziom fluorescencji L37 podczas 15h hipoksji w cytoplazmie oraz w dwóch strefach SGs: pierścieniu i obszarze centralnym (J). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).



Ryc. 16 Lokalizacja L44 (czerwona fluorescencja) i białka PAB2 (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C) i hipoksji (15h; D-I) i reoksygenacji (15+6, G-I). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm . Względny poziom fluorescencji L37 podczas 15h hipoksji w cytoplazmie oraz w dwóch strefach SGs: pierścieniu i obszarze centralnym (J). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).



Ryc. 17 Lokalizacja WIN1 (A-F), PCO1 (G-L) (czerwona fluorescencja) i poli(A) RNA (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C, G-I) i hipoksji (15h; D-F, J-L). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m



Ryc. 18 Lokalizacja 5'UTR RPB1 (czerwona fluorescencja) i poli(A) RNA (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* podczas hipoksji (15h; A-C). Lokalizacja 5'UTR HUP7 (czerwona fluorescencja) i HUP7 CDS (niebieska fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* podczas hipoksji (15h; D-F). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m.

5.8 LOKALIZACJA M6A W KORZENIACH *L. ANGUSTIFOLIUS*

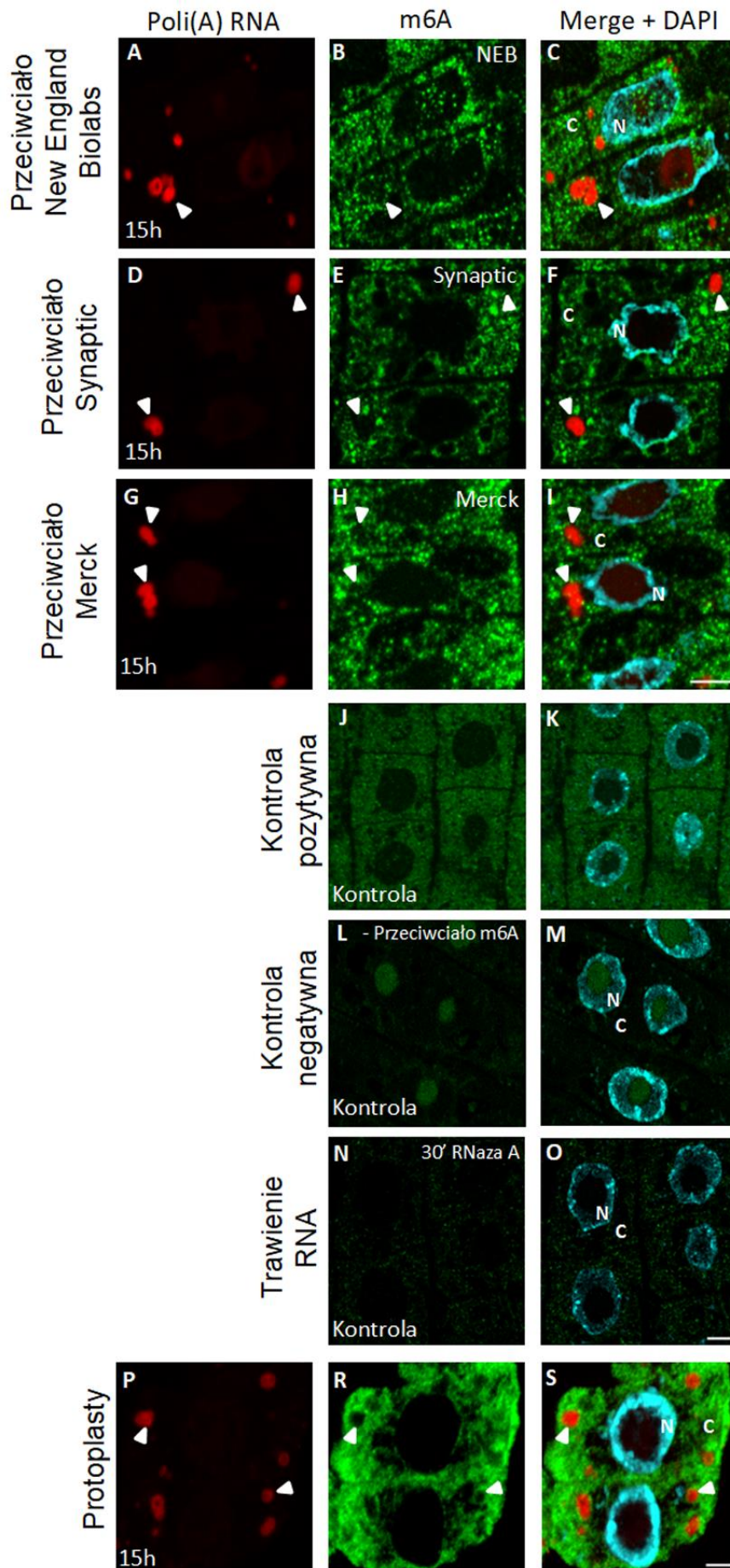
Obecność białek zawierających domenę YTH, odpowiedzialną za rozpoznawanie modyfikacji m6A, została potwierdzona w granulach stresowych u *A. thaliana* podczas stresu cieplnego (Kosmacz i wsp. 2019; Scutenaire i wsp. 2018). W związku z powyższym w celu zbadania, czy u *L. angustifolius* w trakcie stresu niedotlenienia w SG obecne są RNA zawierające modyfikację m6A, przeprowadzono reakcję FISH do poli(A) RNA wraz z immunofluorescencyjnym znakowaniem m6A.

Ponieważ jest to pierwsze zastosowanie przeciwciał do m6A na materiale roślinnym w technikach *in situ*, przeprowadzono szereg doświadczeń sprawdzających specyficzność przeciwciał. Na wstępie zastosowano trzy różne, dostępne komercyjnie przeciwciała. Wszystkie wykazały podobny wzorzec znakowania, jednak najlepszą jakość sygnału reakcji uzyskano przy użyciu monoklonalnego przeciwciała króliczego anty-m6A (New England Biolabs), które ostatecznie zostało wybrane do dalszych analiz (Ryc. 19A-I). Dodatkowo,

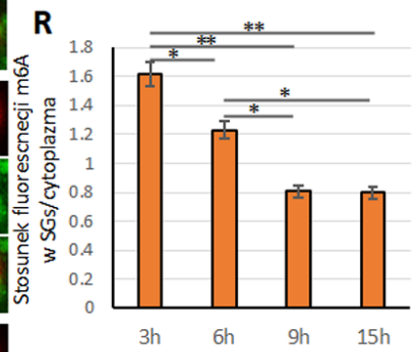
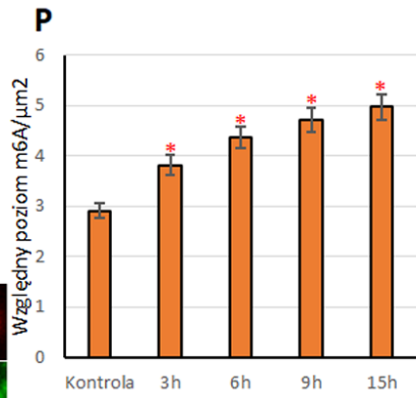
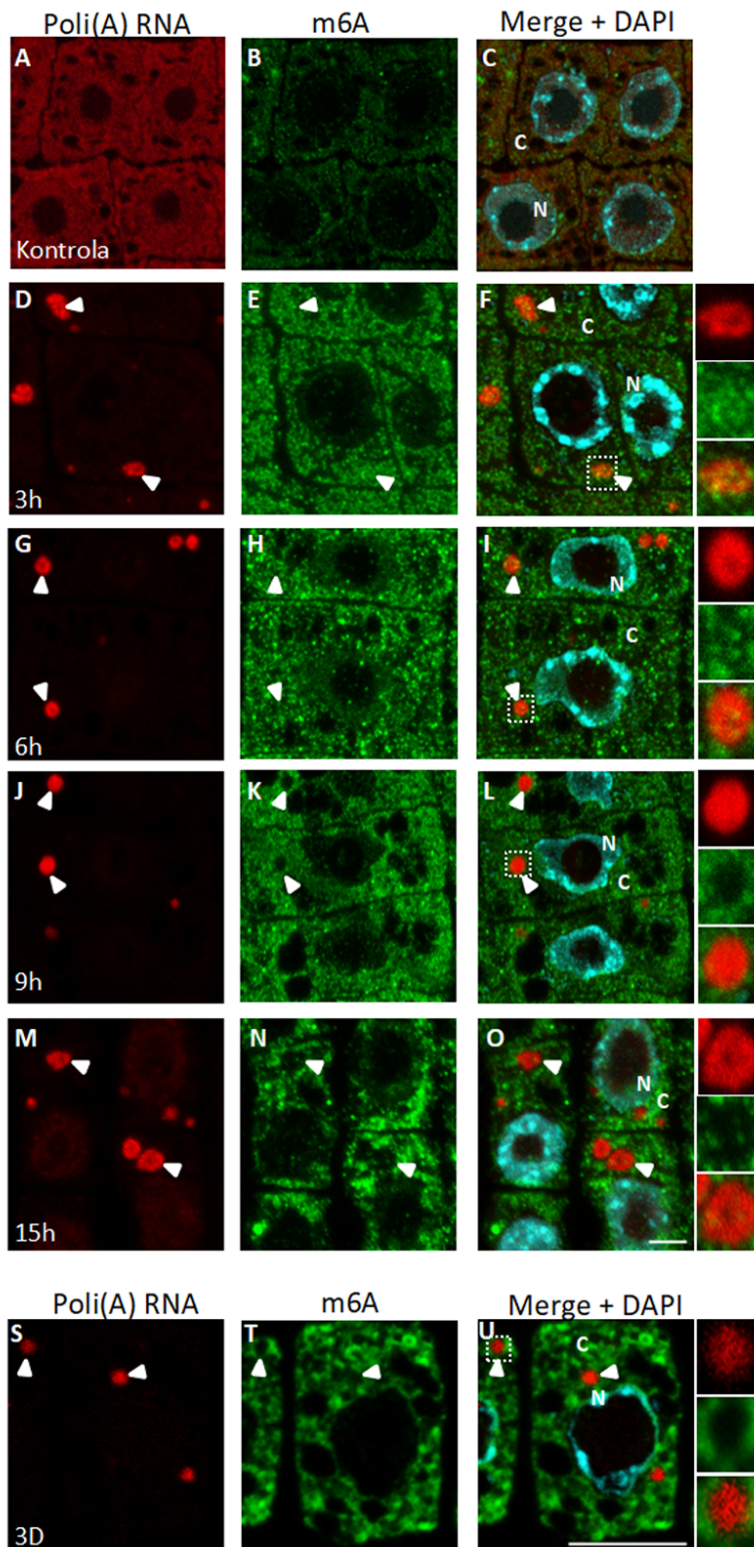
specyficzność sygnału zweryfikowano poprzez wykonanie reakcji immunofluorescencyjnej z pominięciem inkubacji z przeciwciałem pierwotnym (kontrola negatywna reakcji) oraz po potraktowaniu półcienkich skrawków korzeni RNazą A (Ryc. 19J-O). Specyficzność uzyskanego znakowania potwierdzono również w reakcji fluorescencyjnej immunolokalizacji m6A z wykorzystaniem innej metody preparatyki materiału roślinnego - na protoplastach komórek merystematycznych utrwalonych korzeni łubinu (Ryc. 19P-S).

W warunkach kontrolnych u łubinu m6A ulegał jednorodnej dystrybucji w cytoplazmie komórek korzeni, gdzie silnie kolokalizował z poliadenylowanym RNA (Ryc. 20A-C). Po trzech i sześciu godzinach niedotlenienia odnotowano wzrost poziomu m6A w cytoplazmie, odpowiednio o 30 i 50% w stosunku do warunków fizjologicznych (Ryc. 20P). Na terenie pojawiających się granул stresowych sygnał wykazywał pełną kolokalizację z poli(A) RNA (Ryc. 20D-I). W kolejnych godzinach hipoksji, tj. po dziewięciu i piętnastu godzinach, zaobserwowano dalszy wzrost poziomu fluorescencji świadczącego o obecności m6A, jednak w granulach stresowych sygnał ten był wyraźnie słabszy, kontrastując z otaczającą je intensywnie wyznakowaną cytoplazmą (Ryc. 20J-O, P). Analiza ilościowa poziomu fluorescencji wykazała, że stosunek sygnału w SG do cytoplazmy był najwyższy we wczesnej fazie stresu i zmniejszył się o połowę w ciągu kolejnych dziewięciu - piętnastu godzin niedotlenienia (Ryc. 20R).

Następnie, aby zweryfikować, czy obniżenie poziomu m6A w granulach stresowych podczas wydłużonego stresu niedotlenienia jest specyficzne dla gatunku, przeprowadzono badania immunolokalizacji tej modyfikacji na skrawkach półcienkich korzeni *A. thaliana*, poddanych trzydniowej hipoksji. Jednoczesna lokalizacja poli(A) RNA i m6A ujawniła istotnie niższy poziom sygnału m6A w SG w porównaniu z cytoplazmą (Ryc. 20S-U). Rozkład fluorescencji był zbliżony do tego obserwowanego dla *L. angustifolius* po dziewięciu-piętnastu godzinach niedotlenienia. Powyższe wyniki dowodzą, że m6A gromadzi się w SG w początkowych etapach ich powstawania, a następnie jego obecność w tych strukturach obniża się wraz z czasem trwania stresu.



Ryc. 19 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i m6A (zielona fluorescencja) z użyciem 3 różnych przeciwciał, na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* podczas hipoksji (15h) (A-I). Kontrola pozytywna (J-K), negatywna (L-M) i po 30' trawieniu RNazą A (N-O), reakcji immunolokalizacji m6A z użyciem przeciwciała New England Biolabs na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (kontrola). Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i m6A (zielona fluorescencja) z użyciem przeciwciała New England Biolabs na protoplastach komórek merystematycznych korzeni *L. angustifolius* podczas hipoksji (15h) (P-S). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m



Ryc. 20 Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i m6A (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (A-C) i hipoksji (3h, 6h, 9h, 15h; D-O). Względny poziom fluorescencji m6A w cytoplazmie (P) i stosunek poziomu fluorescencji w SGs do cytoplazmy (R) w warunkach fizjologicznych (kontrola) i kolejnych godzinach niedotlenienia (3h, 6h, 9h, 15h). Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i m6A (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *A. thaliana* podczas hipoksji (3D) (S-U). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (C, F, I, L, O, U). Prawy panel reprezentuje powiększenia SGs, zaznaczone kwadratem. Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μm. Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).

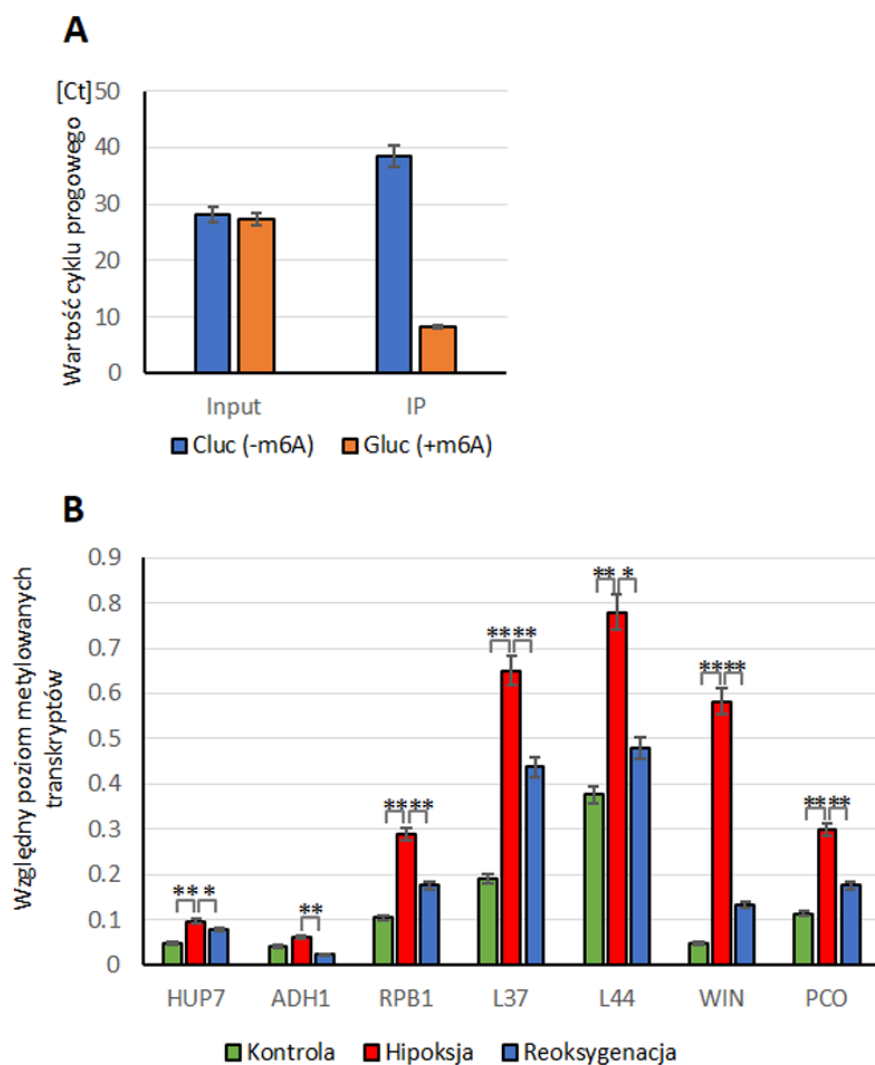
5.9 ZMIANY POZIOMU METYLACJI M6A WYBRANYCH MRNA PODCZAS STRESU NIEDOTLENIENIA

W kolejnym etapie badań, podjęto próbę oceny, czy stopień metylacji adenozyne w transkryptach jest skorelowany z ilością i lokalizacją m6A w komórce. W tym celu przeprowadzono immunoprecypitację m6A a następnie na frakcji RNA wzbogaconej w m6A wykonano analizę RT-qPCR (MeRIP-RT-qPCR). Specyficzność przeciwciała anti-m6A użytego w reakcji immunoprecypitacji została wcześniej potwierdzona w badaniach *A. thaliana* (Bhat i wsp. 2020). Dla dodatkowej weryfikacji oraz oceny efektywności immunoprecypitacji dla *L. angustifolius* przeprowadzono reakcję kontrolną. W tym celu próbę RNA z korzeni łubinu wzbogacono o wzorcowe RNA zawierające m6A (Gluc, + m6A) oraz pozbawione m6A (Cluc, - m6A). Następnie próbę poddano immunoprecypitacji, po której wykonano RT-qPCR. Transkrypty wybrano na podstawie danych transkryptomicznych i ich lokalizacji *in situ*.

W próbach kontrolnych przed immunoprecypitacją (Input) wartość cyklu progowego (Ct) dla obu badanych amplikonów wynosiła około 28 (Ryc. 21A). Po reakcji immunoprecypitacji m6A zaobserwowano różnice w wartościach Ct. Dla próby pozbawionej modyfikacji m6A wartość Ct wzrosła do 38, natomiast dla próby zawierającej m6A wartość Ct wyniosła 8. Wynik ten potwierdza prawidłowy przebieg reakcji immunoprecypitacji i skuteczne strącenie frakcji RNA zawierającej m6A.

Następnie reakcję immunoprecypitacji m6A przeprowadzono na próbach RNA pozyskanych z korzeni *L. angustifolius* hodowanych w warunkach kontrolnych, piętnastogodzinnej hipoksji i sześciogodzinnej reoksygenacji. Analiza RT-qPCR wykazała znaczne różnice w poziomie metylowanych transkryptów, zarówno pomiędzy badanymi genami, jak i wariantami (Ryc. 21B). Dla wszystkich badanych genów wykazano wzrost ilości metylowanych transkryptów w odpowiedzi na stres niedotlenienia oraz ich spadek w czasie

reoksygenacji. W przypadku genów odpowiedzi na stres *ADHI* i *HUP7*, które w czasie niedotlenienia charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji, stopień metylacji był istotnie niższy we wszystkich badanych warunkach w porównaniu do pozostałych genów. Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że jedynie dla *ADHI* wzrost poziomu metylacji w trakcie stresu nie był istotnie statystyczny. Natomiast dla genów metabolizmu podstawowego odnotowano silny wzrost m6A w transkryptach w warunkach hipoksji, co koreluje ze spadkiem poziomu ich ekspresji. Szczególnie widoczne było to dla genów *L37* i *WIN1*. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźną negatywną korelację pomiędzy poziomem m6A a ekspresją badanych transkryptów we wszystkich analizowanych wariantach eksperymentu. Ponadto analizowane transkrypty, w których zaobserwowano wzrost poziomu m6A w odpowiedzi na stres, wykazywały identyczny wzorzec dystrybucji w SG, niezależnie od zmian poziomu ich ekspresji podczas stresu. Natomiast mRNA *ADHI*, dla którego nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian poziomu m6A podczas stresu, nie był obecny w pierścieniu SG.



Ryc. 21 Wydajność reakcji immunoprecypitacji m6A określona na podstawie wartości cykli progowych (C_t) w próbie przed (Input) i po (IP) immunoprecypitacji dla RNA wzorcowego zawierającego m6A (Gluc) oraz pozbawionego m6A (Cluc) (A). Względy poziom m6A metylowanych transkryptów w warunkach fizjologicznych (kontrola), hipoksji (15h) i reoksygenacji (15+6) (B). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice pomiędzy oznaczonymi porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).

5.10 METYLACJA TRANSKRYPTOMU KORZENI *L. ANGUSTIFOLIUS* W PODCZAS STRESU NIEDOTLENIEŃ I POWROTU DO WARUNKÓW FIZJOLOGICZNYCH

W związku z zaobserwowanymi zmianami poziomu sygnału m6A w reakcji immunofluorescencyjnej oraz korelacją między stopniem metylacji adenozyiny a poziomem ekspresji poszczególnych mRNA w warunkach stresu, przeprowadzono szczegółową analizę dynamiki N6-metyloadenozyiny na poziomie transkryptomu w kolejnych etapach niedotlenienia i powrotu do warunków fizjologicznych. W tym celu korzenie *L. angustifolius* hodowane w warunkach kontrolnych, poddane sześć- i piętnastogodzinnemu godzinemu niedotlenieniu oraz sześciogodzinnemu ponownemu natlenieniu poddano izolacji poli(A) RNA, które następnie wykorzystano do immunoprecypitacji m6A i analiz metodą MeRIP-Seq.

Uzyskane dane MeRIP-Seq zostały poddane wstępnej obróbce i analizie bioinformatycznej, co pozwoliło na ocenę wiarygodności wyników oraz selektywności procesu immunoprecypitacji. Wyniki mapowania odczytów do rRNA wykazały znaczące różnice między próbkami przed (Input) i po immunoprecypitacji m6A (IP). W próbkach Input udział odczytów zmapowanych do rRNA wahał się od 8,5% do 16,8%, podczas gdy w próbkach po immunoprecypitacji ich odsetek zmniejszył się do 3 - 4,4% we wszystkich badanych wariantach (Ryc. 22A). Spadek udziału odczytów rRNA po immunoprecypitacji wskazuje na wysoką selektywność procedury, skutecznie izolującej mRNA zawierające m6A. Uzyskane odczyty następnie zmapowano do genomu referencyjnego *LupAngTanjil_v1.0.55* dostępnego w bazie ENSEMBL Plants (Yates i in., 2022) w celu identyfikacji wcześniej adnotowanych transkryptów. Średnio 91% sekwencji zostało dopasowanych do genomu referencyjnego, co potwierdza wysoką jakość i kompletność uzyskanych danych.

W celu oceny zmienności danych pomiędzy próbkami oraz weryfikacji spójności powtórzeń biologicznych przeprowadzono analizę PCA. Główna składowa (PC1), odpowiadająca za 57% wariancji, różnicowała próby zgodnie z warunkami eksperymentalnymi, podczas gdy druga składowa (PCA2), wyjaśniająca 19% wariancji, umożliwiała rozdzielenie prób przed i po immunoprecypitacji (Ryc. 22B). Analiza wykazała, że próby po hipoksji były wyraźnie odseparowane od kontroli, przy czym największe oddalenie

zaobserwowano dla prób poddanych piętnastogodzinnemu niedotlenieniu. Próby po reoksygenacji znajdowały się bliżej grup kontrolnych, co wskazuje na częściowy powrót do stanu wyjściowego. Wysoka zgodność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi potwierdziła wiarygodność uzyskanych wyników. Rozkład prób na wykresie PCA podkreśla istotne różnice w transkryptomie i m6A mRNA w zależności od warunków eksperymentalnych.

Zbadanie dynamiki rozmieszczenia m6A na mRNA w warunkach kontrolnych, hipoksji oraz po reoksygenacji wykonano poprzez przeanalizowanie rozkładu odczytów MeRIP-seq wzdłuż długości transkryptów, uwzględniając próby przed oraz po immunoprecypitacji m6A (Ryc. 22D). W próbach przed immunoprecypitacją odczyty rozkładały się równomiernie na całej długości transkryptu, bez wyraźnych pików w regionach początku (TSS, Transcription Start Site) i końca transkrypcji (TES, Transcription End Site). Niższy poziom odczytów w sekwencji kodującej (z ang. coding DNA sequence, CDS) w tych próbach wynikał z cech transkryptomu oraz procesów technicznych, takich jak obecność intronów, fragmentacja RNA i przygotowanie bibliotek sekwencyjnych, które wpływają na reprezentację różnych regionów transkryptów w danych RNA-seq. W próbach po immunoprecypitacji m6A w warunkach kontrolnych najwyższą ilość odczytów zaobserwowano w TES i 3'UTR, podczas gdy umiarkowane wartości odnotowano w regionie CDS. Po sześciu godzinach hipoksji zaobserwowano zwiększenie ilości odczytów w obszarze TES i 3'UTR, przy jednoczesnym obniżeniu ich poziomu w CDS w porównaniu do próby kontrolnej. W warunkach piętnastogodzinnej hipoksji ilość odczytów w TES była niższa, niż po sześciu godzinach, natomiast odczyty w regionie CDS wzrosły, co sugeruje przesunięcie wzorca rozmieszczenia metylacji. Po reoksygenacji profil rozmieszczenia uległ przywróceniu do stanu przed hipoksją, z zachowaniem zbliżonych wartości w TES i umiarkowanych w CDS. Uzyskane wyniki wskazują, że m6A występuje w znaczących ilościach głównie w obszarze 3' transkryptów. Powyższe analizy wykazują niewielkie zmiany ale zauważalny jest wzrost poziomu m6A w pierwszych etapach hipoksji a następnie spadek podczas długiego niedotlenienia.

W celu zbadania zależności między poziomem ekspresji danego transkryptu a wzbogaceniem w m6A, przeanalizowano zależność zlogarytmowanych (\log_2) średnich wartości FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) dla prób Input (reprezentujących poziom ekspresji transkryptów – oś X) oraz współczynnika wzbogacenia w m6A, obliczonego jako stosunek średnich wartości FPKM w próbach IP do Input ($\log_2(\text{m6A enrichment})$) – oś Y) (Ryc. 22E). W warunkach kontrolnych większość punktów reprezentujących poszczególne transkrypty była skupiona wokół wartości 0 dla współczynnika wzbogacenia w m6A. Linia regresji wykazała niewielką, ale statystycznie istotną tendencję

malejącą ($R^2 = 0,0098$), co oznacza, że transkrypty o wyższym poziomie ekspresji miały nieco niższe wzbogacenie w m6A. Po sześciu godzinach hipoksji rozkład punktów był zbliżony do próby kontrolnej, jednak współczynnik determinacji ($R^2 = 0,016$) wskazywał na silniejszą odwrotną zależność między poziomem ekspresji a wzbogaceniem w m6A w porównaniu do kontroli. Natomiast piętnaście godzin hipoksji skutkowało bardziej rozproszonym rozkładem punktów, a tendencja malejąca była słabsza ($R^2 = 0,0089$), co sugeruje zmniejszenie specyficzności wzbogacenia w m6A w przypadku przedłużającego się niedotlenienia. Podczas reoksygenacji rozkład punktów przypominał próbę kontrolną, a linia regresji wskazywała na bardzo słabą tendencję malejącą ($R^2 = 0,0068$). Wyniki te wskazują, że wzorec wzbogacenia transkryptów w m6A częściowo wraca do stanu wyjściowego po powrocie z hipoksji do warunków fizjologicznych.

Następnie przeprowadzono analizę wzbogacenia w m6A (\log_2 m6A enrichment) dla różnicowo ekspresjonowanych genów, których poziom ekspresji wzrastał lub obniżał się w danym wariancie prób. Geny podzielono na trzy kategorie, w zależności od krotności zmian poziomu ekspresji (\log_2 Fch): Low, Mid i High, co umożliwiło ocenę dynamiki metylacji w kontekście stopnia regulacji ekspresji. Wyniki przedstawiono na wykresie gęstości, obrazującym rozkład wartości \log_2 (m6A enrichment) w każdej kategorii. Oś X prezentowała wartości wzbogacenia m6A (\log_2 (m6A enrichment)), a oś Y ukazywała rozkład tych wartości dla wszystkich genów w danej kategorii. W celu zapewnienia porównywalności między kategoriami, rozkłady zostały znormalizowane tak, aby suma dla każdej kategorii wynosiła jeden, niezależnie od liczby genów w niej zawartych.

W warunkach sześciogodzinnej hipoksji geny o podwyższonej ekspresji (up-regulated) z kategorii o niskim stopniu regulacji (Low-Up) wykazywały najszerszy rozkład wartości \log_2 (m6A enrichment), odzwierciedlający dużą zmienność poziomu wzbogacenia w tej grupie (Ryc. 23A). Mediana rozkładu znajdowała się blisko 0, co sugeruje brak wyraźnego trendu wzbogacenia w m6A dla większości genów tej kategorii. W kategorii Mid-Up rozkład był bardziej skupiony, wskazując na większą jednorodność wartości, a mediana poniżej 0 wskazywała na umiarkowane obniżenie wzbogacenia w m6A. W kategorii High-Up natomiast rozkład był najwęższy, z wyraźnym pikiem poniżej 0, co oznacza, że geny, o najwyższej krotności podwyższenia ekspresji charakteryzowały się najniższym stopniem metylacji spośród analizowanych kategorii. Dla genów o obniżonej ekspresji (down-regulated) kategoria Low-Down również wykazywała szeroki rozkład wartości, z medianą bliską 0, co sugerowało brak wyraźnego wzorca wzbogacenia (Ryc. 23B). W kategorii Mid-Down rozkład był węższy i najbardziej jednorodny spośród analizowanych kategorii, a mediana poniżej 0 sugerowała

umiarkowane obniżenie wzbogacenia w m6A. Z kolei kategoria High-Down charakteryzowała się podwójnym szczytem rozkładu: jeden szczyt znajdował się wyraźnie poniżej 0, a drugi w zakresie wartości dodatnich. Taki rozkład wskazuje na istnienie dwóch grup genów: jednych o niskim poziomie metylacji oraz innych o wysokim stopniu metylacji, których ekspresja uległa największemu obniżeniu.

Podczas piętnastogodzinnej hipoksji rozkład wzbogacenia m6A dla genów o zwiększonej ekspresji przypominał ten opisany dla sześciu godzin. W kategorii High-Up rozkład był nadal wąski, ale nieco szerszy niż po sześciu godzinach hipoksji, co mogło wskazywać na większą zmienność w tej grupie. Mediana nadal znajdowała się wyraźnie poniżej 0, przy jednoczesnym pojawieniu się drugiego, niewielkiego piku odpowiadającego genom o silnym wzroście ekspresji z wysokim poziomem metylacji (Ryc. 23C). W przypadku genów o obniżonej ekspresji, kategoria Low-Down wykazywała węższy rozkład w porównaniu do sześciu godzin hipoksji, z medianą bliską 0 (Ryc. 23D). Kategoria Mid-Down charakteryzowała się najbardziej skupionym rozkładem, jednak mediana przesunęła się bardziej w kierunku wartości ujemnych, wskazując na wzrost obniżenia wzbogacenia w m6A. Natomiast w kategorii High-Down rozkład stał się bardziej skupiony, a mediana znajdowała się wyraźnie poniżej 0, co wskazuje na utrzymujące się znaczne obniżenie wzbogacenia dla większości genów o silnie obniżonej ekspresji.

Po reoksygenacji w kategorii Low-Up dla genów o zwiększonej ekspresji rozkład wartości wzbogacenia m6A był podobny do rozkładu tej samej kategorii genów w szóstej godzinie niedotlenienia (Ryc. 23E). W kategoriach Mid-Up i High-Up rozkład stał się bardziej skupiony, a mediana przesunęła się bliżej 0, co sugeruje zmniejszenie zróżnicowania stopnia metylacji i częściowe przywrócenie wzbogacenia w m6A dla większości genów w tych grupach. Dla genów o obniżonej ekspresji (down-regulated), kategoria Low-Down zachowała szeroki rozkład z medianą bliską 0, wskazując na brak wyraźnego trendu w zmianie wzbogacenia (Ryc. 23F). Natomiast w kategoriach Mid-Down i High-Down rozkłady były bardziej stabilne, z medianą pozostającą poniżej 0, co świadczy o utrzymującym się podobnej wartości wzbogaceniu w m6A w tych grupach.

Dynamika wzbogacenia w m6A wykazywała zróżnicowanie w zależności od warunków eksperymentalnych oraz poziomu zmian ekspresji genów. W przypadku genów o podwyższonej ekspresji rozkład wzbogacenia pozostawał podobny, niezależnie od badanego wariantu, co zaobserwowano również dla genów o obniżonej ekspresji. We wszystkich analizowanych wariantach geny o wysokim wzroście poziomu ekspresji charakteryzowały się najmniejszym stopniem zróżnicowania poziomu wzbogacenia m6A i jednocześnie jego najniższym poziomem

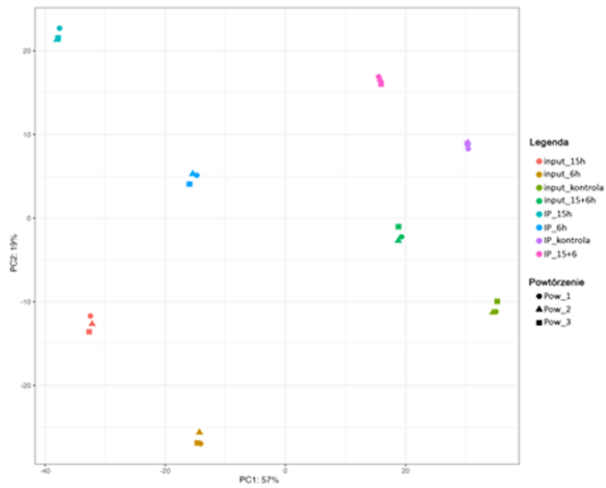
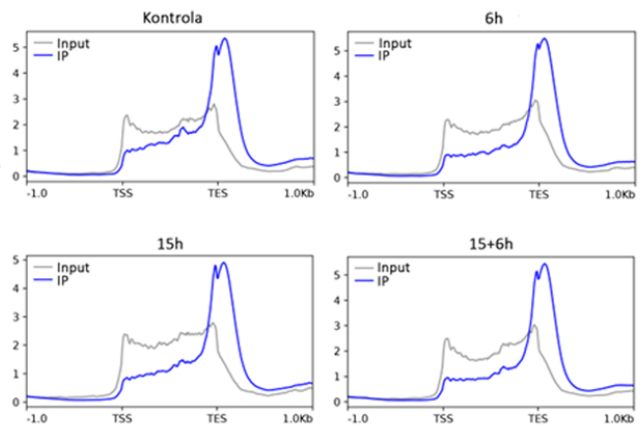
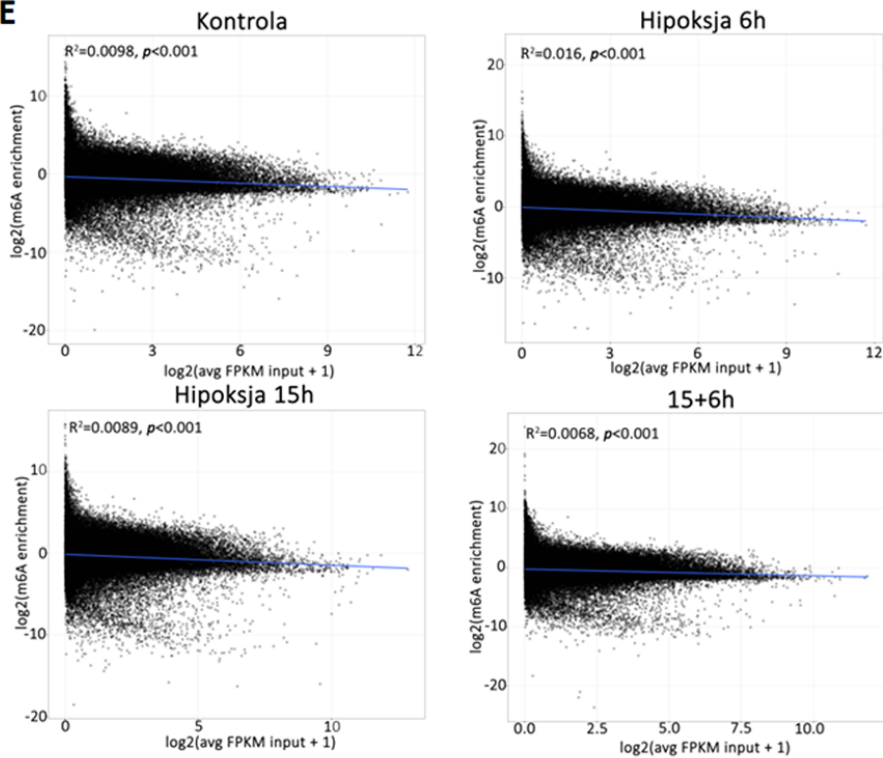
spośród wszystkich badanych kategorii. Natomiast geny o niskim stopniu zmian ekspresji, zarówno regulowanych w dół, jak i w górę, wykazywały najmniejsze różnice w poziomie m6A pomiędzy wariantami.

A

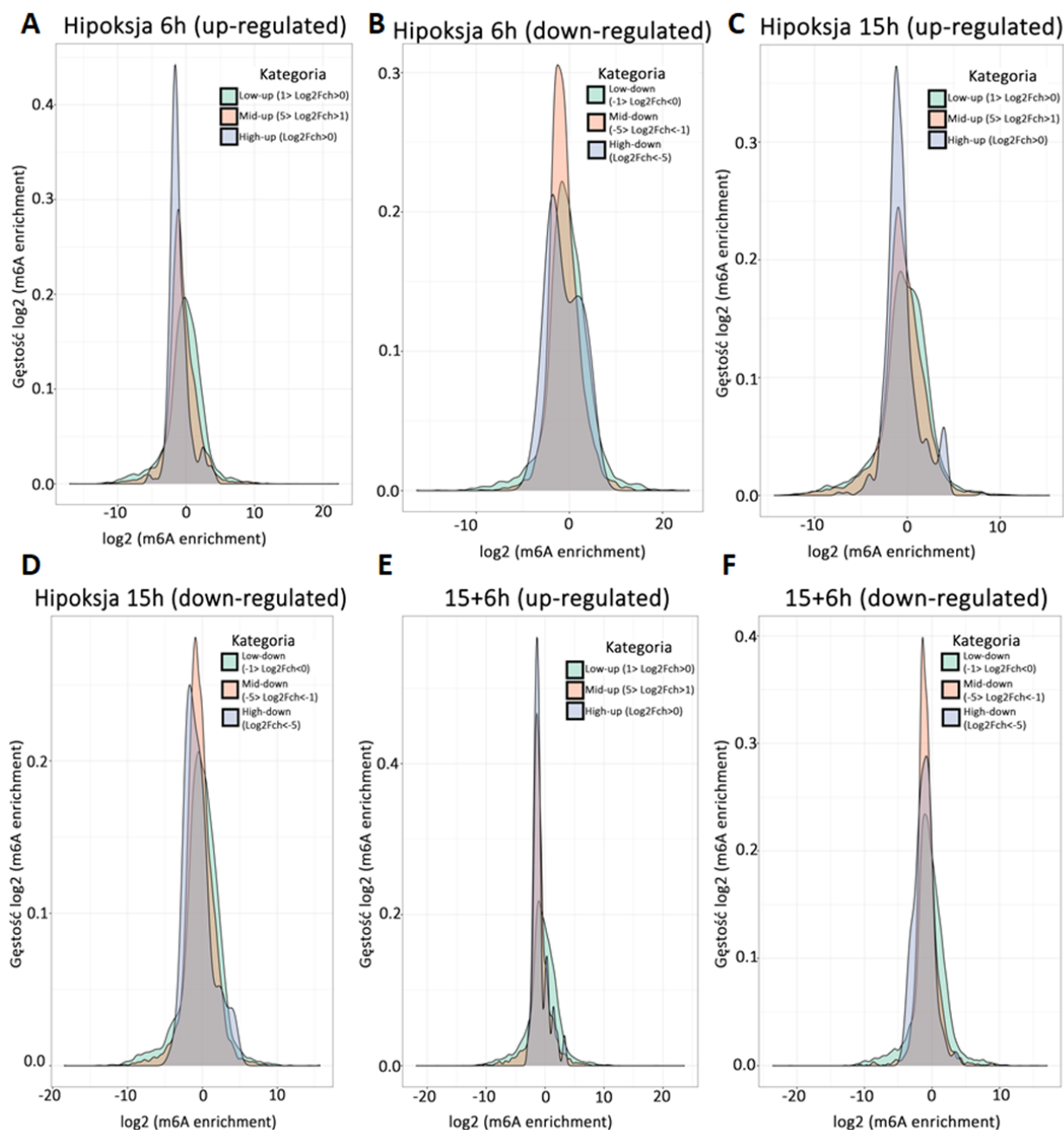
Nazwa próby	% odczytów rRNA
Input-Kontrola	11.3%
Input-hipoksja-6h	12.7%
Input-hipoksja-15h	16.2%
Input-Reoksygenacja	8.8%
IP -Kontrola	4.0%
IP-hipoksja-6h	4.3%
IP -hipoksja-15h	4.1%
IP -Reoksygenacja	3.0%

B

Nazwa próby	% pokrycia z genomem ref.
Input-Kontrola	90,4%
Input-hipoksja-6h	91%
Input-hipoksja-15h	90%
Input-Reoksygenacja	91,1%
IP -Kontrola	91,3%
IP-hipoksja-6h	92,5%
IP -hipoksja-15h	91,7%
IP -Reoksygenacja	92,7%

C**D****E**

Ryc. 22 Procentowa wartość odczytów zmapowanych do rRNA (A) oraz stopień pokrycia odczytów z genomem referencyjnym (B) na podstawie wyników MeRIP-Seq bibliotek przygotowanych z prób przed (Input) oraz po reakcji immunoprecypitacji m6A (IP) z korzeni *L. angustifolius* w warunkach fizjologicznych (kontrola), hipoksji (6h, 15h) i reoksygenacji (15+6). Analiza głównych składowych (PCA) danych MeRIP-Seq dla 3 powtórzeń biologicznych (Pow_1-3) w oparciu o poziomy ekspresji genów wyżej wymienionych prób (C). Rozkład znormalizowanych na głębokość biblioteki odczytów, wzdłuż transkryptów wyżej wymienionych prób (D). Wykres rozrzutu przedstawiający zależność między zlogarytmowaną (\log_2) średnią wartością FPKM dla prób Input (reprezentującą poziom ekspresji transkryptów – oś X) oraz współczynnikiem wzbogacenia w m6A, obliczonego jako stosunek średnich wartości FPKM w próbach IP do Input ($\log_2(\text{m6A enrichment})$) – oś Y), R2 – współczynnik determinancji (E).



Ryc. 23 Wykres gęstości przedstawiający rozkład logarytmowanej wartości wzbogacenia m6A ($\log_2(\text{m6A enrichment})$) dla różnicowo ekspresowanych genów (DEGs), których ekspresja wzrasta (**A, C, E**) lub maleje (**B, D, F**) w porównaniach pomiędzy 6h hipoksją a kontrolą (**A-B**) 15 godzinną hipoksją a kontrolą (**C-D**) oraz 6 godzinną reoksygenacją a kontrolą (**E-F**). Geny zostały podzielone na trzy kategorie w zależności od krotności zmiany poziomu ekspresji ($\log_2 Fch$): Low ($0 < \log_2 Fch \leq 1 / -1 > \log_2 Fch < 0$), Mid ($1 < \log_2 Fch \leq 5 / -5 > \log_2 Fch < -1$), oraz High ($\log_2 Fch > 5 / \log_2 Fch < -5$). Oś X prezentuje wartości wzbogacenia m6A ($\log_2(\text{m6A enrichment})$), a oś Y rozkład tych wartości dla wszystkich genów w danej kategorii.

5.11 WPŁYW m6A NA POWSTAWANIE I SEKWESTRACJĘ POLI(A) RNA W SG U *A.*

THALIANA

Ze względu na brak mutantów *L. angustifolius*, wpływ metylacji m6A na proces powstawania granul stresowych zbadano na korzeniach mutantu *mtaABI3:MTA A. thaliana*. Mutant *mtaABI3:MTA* zawiera insercję T-DNA (SALK_074069) w genie *AT4G10760* (*MTA*), co prowadzi do zahamowania syntezy endogennego białka *MTA* (główniej metylazy m6A mRNA). Mutacja ta jest jednak letalna w formie homozygotycznej na etapie zarodkowym (Zhong i wsp., 2008). Jednak ekspresja cDNA *MTA* pod kontrolą promotora *ABI3* specyficznego dla zarodka pozwala ominąć letalny fenotyp SALK_074069. Konstruktor ten umożliwia syntezę *MTA* przez pierwsze dwa tygodnie wzrostu siewek, następnie silnie ograniczając transkrypcję genu metylazy w późniejszych etapach rozwoju, co skutkuje obniżeniem poziomu m6A o 85–95% w porównaniu z rośliną typu dzikiego (Bodi i wsp., 2012).

Mutant *mtaABI3:MTA A. thaliana*, charakteryzujący się obniżonym poziomem m6A, został wykorzystany do dodatkowej weryfikacji specyficzności przeciwciała anti-m6A w reakcji immunofluorescencji. W tym celu analizę lokalizacji m6A przeprowadzono na półcienkich skrawkach korzeni mutantu *mta* oraz roślin typu dzikiego (WT) *A. thaliana* (Ryc. 24A-D). W komórkach mutantu zaobserwowano znaczący spadek intensywności fluorescencji w porównaniu z WT. Obniżenie poziomu sygnału jest zgodne z przewidywaną redukcją poziomu m6A w komórkach mutantu, a wynik ten potwierdza specyficzność użytego przeciwciała.

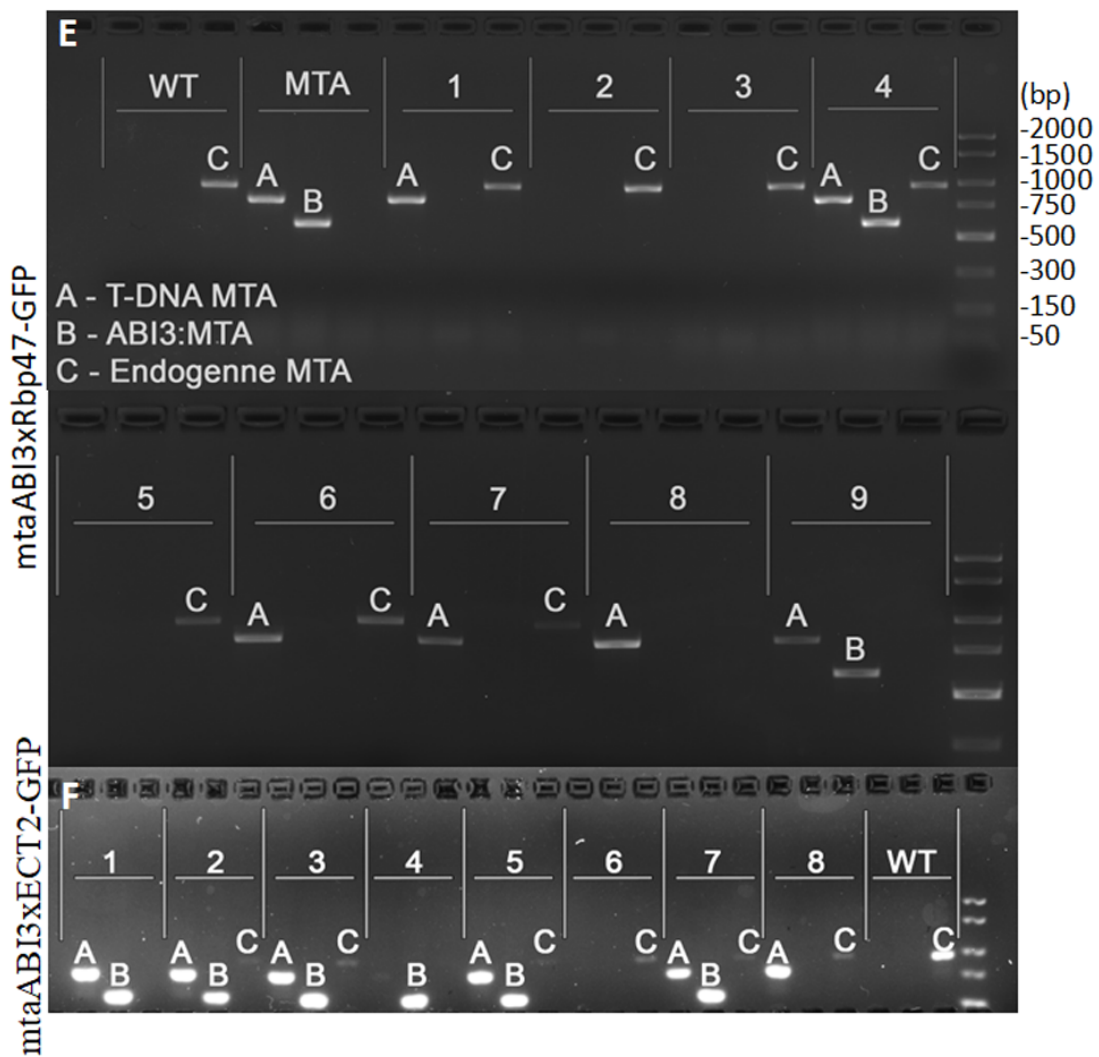
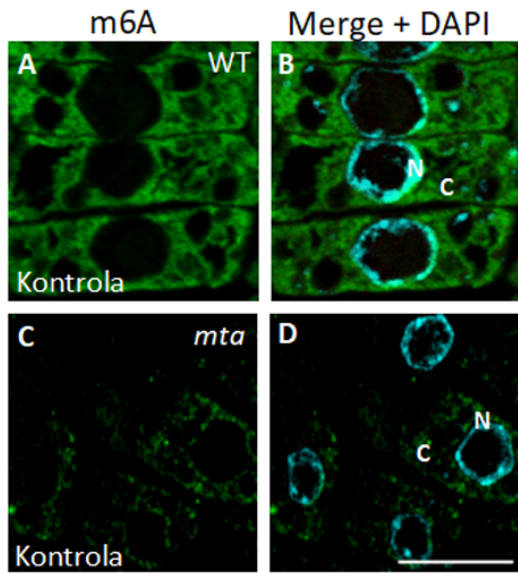
Aby określić potencjalne zmiany w biogenezie i funkcjonowaniu SG na skutek obniżonej metylacji m6A, mutantu *mtaABI3:MTA* skrzyżowano z linią ECT2-GFP (białko odpowiedzialne za rozpoznawanie m6A) oraz Rbp47B-GFP (białko znacznikowe SG). Uzyskane mieszańce po samozapyleniu w pokoleniu F2 poddano obserwacjom mikroskopowym w celu potwierdzenia obecności białka GFP, a następnie sprawdzono ich homozygotyczność i obecność transgeny metodą PCR, z potwierdzeniem wyników przez analizę DNA po rozdziale elektroforetycznym. Homozygotyczność dla insercji SALK_074069 dotyczącej braku aktywności endogennego genu *MTA* sprawdzono dwójako. Po pierwsze na podstawie braku fragmentu 1080 bp endogennego genu *MTA*, po drugie po obecności fragmentu T-DNA o długości 1050 bp. Obecność transgeny *mtaABI3:MTA* potwierdzono wykrywając produkt o wielkości 799 bp.

Analiza wyników amplifikacji PCR i rozdziału elektroforetycznego wykazała, że rośliny typu nr 9 mieszańca *mtaABI3xRbp47-GFP* spełniały kryteria dotyczące obecności

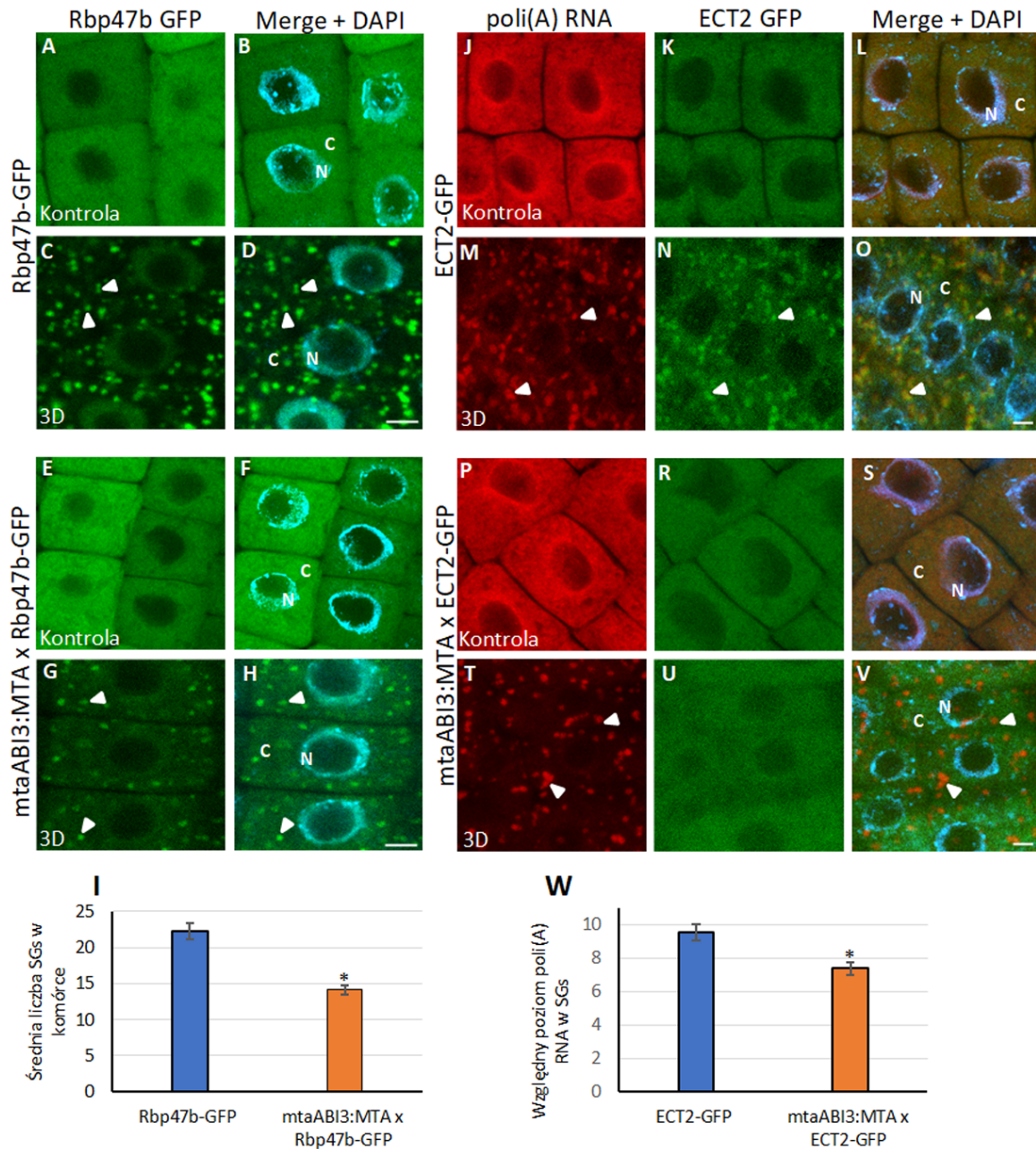
trans genu i homozygotyczności (Ryc. 24E). W przypadku mieszańca *mtaABI3xECT2-GFP* były to rośliny typu nr 1. Wybrane rośliny posłużyły do dalszych analiz (Ryc. 24F).

W kolejnym etapie w celu zbadania, czy metylacja m⁶A jest związana z procesem powstawania i funkcjonowaniem SG, mieszańca *mtaABI3xRbp47-GFP* oraz mutantu *Rbp47-GFP* stanowiącego próbę kontrolną poddano trzydniowej hipoksji, a następnie przeprowadzono analizę mikroskopową (Ryc. 25A-H). W warunkach fizjologicznych obserwowano homogeną fluorescencję GFP na terenie cytoplazmy i jądra komórkowego (Ryc. 25A-B, E-F). Nie odnotowano widocznych różnic w natężeniu oraz dystrybucji sygnału pomiędzy próbą kontrolną, a mutantem *mta*. Po trzech dniach niedotleniania w cytoplazmie roślin kontrolnych obserwowano liczne, silne wyznakowane SG, natomiast w komórkach mutantu *mta*, zarówno liczba, jak i poziom wyznakowania SG były wyraźnie niższe (Ryc. 25C-D, G-H). Dodatkowo w cytoplazmie komórek mutantu *mta* zaobserwowano silniejszy, niż w próbie kontrolnej sygnał GFP poza SG. Analiza ilościowa wykazała, że liczba SG u mutantu o obniżonym poziomie m⁶A była około 40% niższa, niż u WT (Ryc. 25I).

Następnie stresowi niedotlenienia poddano mutanty *mtaABI3xECT2-GFP* oraz *ECT2-GFP*. Po utrwaleniu korzeni wykonano fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* do poli(A) RNA. Również w tym przypadku w warunkach fizjologicznych nie wykazano różnic w poziomie i dystrybucji sygnału pomiędzy badanymi genotypami (Ryc. 25J-L, P-S). Jednorodna fluorescencja GFP widoczna była w jądrze komórkowym i cytoplazmie. Natomiast poli(A) RNA tworzyło homogenny sygnał zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Jednakże zauważalna była silniejsza fluorescencja pochodząca z terenu jądra komórkowego. Z kolei podczas niedotlenienia w próbie kontrolnej sygnał *ECT2-GFP* akumulował w SG i na ich terenie kolokalizował z poli(A) RNA (Ryc. 25M-O). Zaskakująco, u mutantu o obniżonym poziomie m⁶A nie zaobserwowano skupisk fluorescencji *ECT2-GFP*, choć w cytoplazmie występowały ogniska sygnału poli(A) RNA przypominające SG (Ryc. 25T-V). Analiza ilościowa wykazała, że poziom poli(A) RNA w SG u mutantu *mtaABI3xECT2-GFP* był o około 23% niższy, niż w WT (Ryc. 25W). Wynik ten dowodzi, że białko *ECT2* gromadzi się w SG tylko w obecności m⁶A RNA i nie jest niezbędne do powstania tych struktur, natomiast brak metylacji adenozyiny w pozycji 6 skutkuje obniżoną akumulacją mRNA w SG.



Ryc. 24 Lokalizacja *m6A* (zielona fluorescencja) na skrawkach półcienkich korzeni *A. thaliana* typu dzikiego (WT; **A-B**) oraz mutantu *mtaABI3:MTA* o obniżonym poziomie metylacji (*mta*; **C-D**), w warunkach fizjologicznych (kontrola). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (**B, D**). N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m. Produkty reakcji PCR genotypowania mieszańców *mtaABI3xRbp47b-GFP* (**E**) i *mtaABI3xECT2-GFP* (**F**). WT – typ dziki, MTA – mutant *mtaABI3:MTA*, 1-9 – kolejne rośliny pokolenia F2 uzyskanych mieszańców.



Ryc. 25 Lokalizacja białka Rbp47b – GFP (zielona fluorescencja) w komórkach mersytematycznych korzeni transgenicznego (Rbp47-GFP; **A-D**) i mieszańca *mtaABI3:MTA x Rbp47b-GFP* (**E-H**) *A. thaliana* w warunkach fizjologicznych (kontrola) i 3 dniowej hipoksji (3D). Lokalizacja poli(A) RNA (czerwona fluorescencja) i białka ECT2 – GFP (zielona fluorescencja) w komórkach mersytematycznych korzeni transgenicznego (ECT2-GFP; **J-O**) i mutantu *mtaABI3:MTA x ECT2-GFP* (**P-V**) *A. thaliana* w warunkach fizjologicznych (kontrola) i 3 dniowej hipoksji (3D). Nałożenie sygnałów i barwienie DNA DAPI (**B, D, F, H, L, O, S, V**). Groty – granule stresowe, N – jądro komórkowe, C – cytoplazma. Skala 5 μ m. Średnia liczba SGs w komórce korzeni transgenicznego (Rbp47-GFP) *A. thaliana* i mieszańca *mtaABI3:MTA x Rbp47b-GFP* (**I**). Względny poziom poli(A) RNA w SGs w komórkach korzeni transgenicznego (ECT2-GFP) *A. thaliana* i mieszańca *mtaABI3:MTA x ECT2-GFP* (**W**). Słupki błędów wskazują błąd standardowy. Istotne statystycznie różnice pomiędzy porównaniami wskazuje symbol (*) ($P < 0,05$).

DYSKUSJA

6.1 ODPOWIEDŹ NA STRES HIPOKSJI NA POZIOMIE TRANSKRYPTOMU

W odpowiedzi na stres niedotlenienia wywołany całkowitym zanurzeniem siewek w wodzie, w korzeniach łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) dochodzi do silnej reorganizacji transkryptomu. Różnicowej ekspresji w warunkach stresowych uległo 20 136 genów. Ponowne natlenienie częściowo przywracało wzorzec ekspresji charakterystyczny dla korzeni roślin hodowanych w warunkach fizjologicznych. Tak wyraźne zmiany transkryptyczne wskazują, że hipoksja i reoksygenacja indukują specyficzne procesy w korzeniach łubinu, odzwierciedlając dynamiczną odpowiedź komórek na stres oraz proces ich regeneracji po jego ustąpieniu.

Wysoki stopień zróżnicowania wzorca i poziomu ekspresji genów może być wynikiem kilku czynników. Liczba różnicowo ekspresjonowanych genów zależna jest między innymi od rodzaju tkanki roślinnej poddanej stresowi, a także warunków eksperymentalnych (Mustroph i wsp., 2010). Ze względu na osiadły tryb życia roślin w środowisku, korzenie są szczególnie narażone na niedotlenienie, najczęściej jako pierwszy organ doświadczając tego rodzaju stresu. Od ich odpowiedzi na czynnik stresowy zależy przetrwanie całej rośliny. Ponadto liczba genów o zmienionej ekspresji zwiększa się wraz z intensywnością działania czynnika stresowego oraz długością czasu jego trwania (Mustroph i wsp., 2010). Łubin wąskolistny jest rośliną o niskiej tolerancji na niedotlenienie wywołane nadmiarem wody, a tak wysoka liczba różnicowo ekspresjonowanych genów w korzeniach w trakcie wydłużonej piętnastogodzinnej hipoksji odzwierciedla złożone strategie adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska.

O wysokiej specyficzności odpowiedzi łubinu wąskolistnego na stres wywołany zanurzeniem świadczy wysoka korelacja między genami wykazującymi wysoki poziom ekspresji podczas stresu a genami, których ekspresja maleje po jego ustąpieniu. Spośród genów o takiej tendencji największe zmiany zaobserwowano w genach związanych z metabolizmem komórkowym, aktywnością kinaz serynowo-treoninowych oraz biogenezą ściany komórkowej.

Wśród genów regulujących procesy metaboliczne znalazły się *ADHI* i *PDCI* bezpośrednio związane z fermentacją alkoholową oraz *SUS4* i *SUS1* (z ang. sucrose synthase) odpowiedzialne za metabolizm sacharozy. Ich zwiększona ekspresja odzwierciedla adaptację metabolizmu komórkowego do ograniczonej dostępności tlenu, mającą na celu kompensację obniżonej produkcji ATP. Nawet przy niewielkim spadku poziomu tlenu w środowisku dochodzi do zmniejszenia stosunku ATP/ADP. Jednak dopóki jego stężenie nie spadnie poniżej 5%, nie wpływa istotnie na równowagę redoks NADH/NAD⁺ (Geigenberger, 2003).

Nagromadzenie NADH przy jednoczesnym wyczerpaniu dostępnego NAD⁺ mogłoby ostatecznie prowadzić do zahamowania glikolizy, czemu zapobiega utlenianie NADH poprzez fermentację. Wspomniane geny należą do grupy 49 genów rdzeniowych odpowiedzi na hipoksję zidentyfikowanych u *A. thaliana*. Jak wykazano, ich translacja zachodzi preferencyjnie w trakcie stresu, a wiele z tych genów reguluje procesy metaboliczne ukierunkowane na zwiększenie produkcji ATP i aktywację fermentacji (Mustroph i wsp., 2009). Z 38 homologów tych genów zidentyfikowanych u *L. angustifolius*, 21 wykazało wzrost ekspresji w warunkach stresowych, natomiast poziom ich ekspresji ulegał obniżeniu po ustąpieniu stresu. Przywrócenie warunków fizjologicznych skutkuje przejściem na bardziej efektywne oddychanie tlenowe i zmniejszeniem poziomu ekspresji genów zaangażowanych w fermentację. Uzyskane wyniki pozwalają zatem stwierdzić, że stres zanurzenia siewek w wodzie prowadzi do indukcji hipoksji w korzeniach łubinu wąskolistnego.

Zaskakująco, znaczna liczba genów indukowanych w odpowiedzi na stres niedotlenienia była związana z biogenezą ściany komórkowej. Utrzymanie funkcjonalnej integralności oraz właściwości fizycznych ściany komórkowej poprzez modyfikację jej składników jest kluczowym procesem w adaptacji roślin, zarówno do stresów biotycznych, jak i abiotycznych (Le Gall i wsp., 2015; Vaahtera i wsp., 2019; Rui i Dinneny, 2020). Dotychczasowe badania wskazywały jednak na obniżenie ekspresji genów związanych z syntezą ściany komórkowej w warunkach stresu, z powodu znacznych nakładów energii w przebiegu tego procesu (Mustroph i wsp., 2010; Kreuzwieser i wsp., 2009).

Wśród silnie ekspresowanych genów w odpowiedzi na stres niedotlenienia zidentyfikowano grupę genów kodujących endotransglikozylazy/hydrolazy ksyloglukanowe (XTH), ekspansyny (*EXPA11* i *EXPA13*), a także genów związanych z metabolizmem ksyloglukanów, takich jak *XYL1* (z ang. alpha-xylosidase 1) oraz *RSW3* (z ang. glucosidase 2 alpha). Fizyczne interakcje między celulozą a hemicelulozą (ksyloglukanem), będącymi polimerami ściany komórkowej, są modyfikowane przez aktywność ekspansyn i enzymów XTH, co umożliwia zwiększenie rozciągliwości/elastyczności ściany komórkowej (Rose i wsp., 2002; Kende i wsp., 2004). U niektórych gatunków roślin zanurzenie promuje reakcję wzrostu, pomagając im „uciec” przed całkowitym zanurzeniem nad powierzchnię wody (Bailey-Serres i Voeselek, 2008). Podobny mechanizm zaobserwowano w korzeniach łubinu podczas piętnastogodzinnego niedotlenienia, kiedy odnotowano ich wzrost. Jednocześnie wykazano, że wiele podstawowych procesów komórkowych, w tym aktywność transkrypcyjna i translacyjna, ulegają częściowej inhibicji w celu ograniczenia zużycia ATP, na co wskazywało obniżenie ekspresji genów, takich jak *L37* i *L44* kodujących białka rybosomalne oraz *RPB1*,

kodującego największą podjednostkę polimerazy RNA II. Powyższe wyniki pozwalają przypuszczać, że aby ograniczyć koszty energetyczne związane z tworzeniem ściany komórkowej, reakcje wzrostu są rekompensowane poprzez zmniejszenie jej sztywności i remodelowanie strukturalne. Ponadto, modyfikacja anatomii korzeni w trakcie stresu spowodowanego nadmiarem wody może zwiększać dostępność tlenu do komórek oraz redukować jego utratę przez korzenie do gleby (Bramley i wsp., 2011). Mechanizm ten przypomina reakcję obserwowaną w siewkach poddanych niedotlenieniu, kiedy wzrost korzeni wynikał z obniżenia sztywności ściany komórkowej, a następnie jednokierunkowej ekspansji wybranych komórek epidermy, a nie z ich podziału (Cosgrove, 2005; Lee i wsp., 2011).

Obecnie uważa się, że rośliny zasadniczo wykorzystują dwie przeciwstawne strategie przetrwania w odpowiedzi na stres niedotlenienia, które zostały zidentyfikowane u ryżu. Pierwsza, to strategia ucieczki, związana z kierowanym przez gen *SNORKEL* (SK1/SK2) wzrostem rośliny w celu utrzymania jej ponad powierzchnią wody, co wymaga szybkiej alokacji zasobów energetycznych (Hattori i wsp., 2009). Druga, strategia spoczynku, zależy od aktywacji genu *Sub1A* (z ang. Submergence-1A), polegająca na zahamowaniu wzrostu i oszczędzaniu rezerw energetycznych, aż do czasu obniżenia się poziomu wody (Xu i wsp., 2006; Fukao i wsp., 2009).

W przeciwieństwie do ryżu, w genomie łubinu wąskolistnego nie zidentyfikowano dotychczas ortologów genów *Sub1A* i *SNORKEL*. Niemniej jednak wśród kinaz serynowo-treoninowych obecnych u łubinu, wysokim poziomem ekspresji charakteryzowała się kinaza *CIPK15*. Powszechnie wiadomo, że aktywność kinaz białkowych odgrywa kluczową rolę w percepcji czynnika stresowego i transdukcji sygnałów w odpowiedzi roślin na warunki stresowe (Chen i wsp., 2021). Podczas gdy *Sub1A* jest związany z tolerancją na zalanie u dojrzałych roślin ryżu, uważa się, że za odpowiedź siewek poprzez wzrost ponad powierzchnią wody odpowiada *CIPK15*. Rola *CIPK15* obejmuje regulację genów związanych z syntezą cukrów oraz ekspresją *ADHI*, co umożliwia produkcję energii nawet w warunkach ograniczonej ilości tlenu (Lee i wsp., 2009). Tolerancja na zalanie, w której pośredniczy *CIPK15*, odgrywa kluczową rolę w umożliwieniu wzrostu całkowicie zanurzonych siewek i może być szczególnie istotna dla korzeni, które pozostają stale zanurzone w wodzie (Lee i wsp., 2009). Wysoki poziom ekspresji genów *CIPK15*, *ADHI* i *SUS*, wzrost korzeni oraz przebudowa ściany komórkowej, przy jednoczesnym zahamowaniu innych procesów komórkowych, sugerują, że *L. angustifolius* stosuje nie jedną strategię, lecz różnorodne reakcje adaptacyjne, które łagodzą szkodliwe skutki niedotlenienia. Podobny mechanizm złożonej odpowiedzi zaobserwowano u pomidora, innej rośliny uprawnej podatnej na stres hipoksji, gdzie tworzenie aerenchymy za

pośrednictwem etylenu, przerost łodygi oraz formowanie korzeni przybyszowych ułatwiały transport tlenu, stanowiąc mechanizm ucieczki umożliwiający tolerancję na niedotlenienie (Mignolli i wsp., 2020).

W warunkach stresowych zaobserwowano również wysoki poziom mRNA kinazy białkowej 2 (CK2), plejotropowego enzymu odgrywającego kluczową rolę w odpowiedzi na stres abiotyczny oraz w regulacji wzrostu roślin (Agarwal i Ray, 2020). Co istotne, CK2 jest również powiązana z dynamiką granul stresowych oraz regulacją procesu translacji. Pod wpływem stresu CK2 gromadzi się w SG, a fosforylacja białka nukleującego G3BP1 z jej udziałem prowadzi do rozpadu SG u ssaków po ustąpieniu warunków stresowych (Reineke i wsp., 2017). U roślin CK2 wykazuje zdolność fosforylacji czynnika inicjacji translacji eIF5A, który, jak udowodniono, bierze udział w tworzeniu SG w komórkach zwierzęcych (Muench i Dahodwala, 2012; Li i wsp., 2010). Dane transkryptomocne z niniejszych badań wskazują na znaczny wzrost poziomu CK2 w warunkach hipoksji u łubinu, z wyraźnym spadkiem w fazie reoksygenacji. Wyniki te dowodzą, że CK2 może odgrywać kluczową rolę w tworzeniu, a nie rozpadzie SG u roślin. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań w przyszłości.

6.2 POWSTAWANIE I FUNKCJA GRANUL STRESOWYCH W WARUNKACH NIEDOTLENIENIA

W korzeniach łubinu podczas stresu niedotlenienia wywołanego całkowitym zanurzeniem siewek obserwowano pojawianie się struktur cytoplazmatycznych. Wykryto w nich obecność białka znacznikowego granul stresowych PAB2 oraz wysoki poziom poli(A) RNA. Dodatkowo w korzeniach traktowanych cykloheksymidem, który powoduje blokowanie translacji hamując aktywność transferazy peptydylowej a jednocześnie zakotwicza mRNA na rybosomach, nie obserwowano obecności skupisk cytoplazmatycznych. Jest to konsekwencją braku wolnych transkryptów do tworzenia skupisk w cytoplazmie. Powyższe wyniki jednoznacznie udowadniają obecność granul stresowych w komórkach merystematycznych i zróżnicowanych korzeni *L. angustifolius* podczas stresu niedotlenienia.

W badaniach korzeni łubinu wskazano kolejne etapy montażu SG podczas stresu niedotlenienia. Struktury powstają już po pierwszej godzinie trwania hipoksji, jako drobne skupiska w cytoplazmie, które następnie łączą się ze sobą, zwiększając rozmiar i zmieniając morfologię. Przyjmują często formę połączonych dwóch, trzech okrągłych struktur. Pomimo, że u *A. thaliana* pokazano, że w miarę trwania stresu cieplnego SG łączy się ze sobą a ich ilość nieznacznie wzrasta, struktury te są zdecydowanie mniejsze, jest ich więcej i mają w przeciwieństwie do łubinu jednolitą budowę (Hamada i wsp., 2018).

W niniejszej pracy badano także funkcję SG. Powszechnie uważa się, że SG powstają w wyniku zatrzymania translacji. U łubinu ujawniono wzrost poziomu mRNA kodującego kinazę białkową 2 (CK2) w hipoksji. W warunkach stresowych u zwierząt CK2 fosforyluje czynniki inicjacji translacji, takie jak: eIF2 α , eIF2 β , eIF3c, eIF4B. Wykazano, że fosforylacja eIF2 α hamuje aktywność eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2B (eIF2B) i prowadzi do akumulacji mRNA związanych z niekompletnym kompleksem preinicjacji 48S (PIC) (Baymiller i Moon, 2023). Fosforylacja eIF2 α jest zatem głównym motorem hamowania inicjacji translacji, prowadzącym do uwolnienia mRNA z rybosomów. Taki mRNA może być głównym czynnikiem indukującym powstawanie SG. Jednakże u roślin brak jest danych dotyczących czasowej i przestrzennej zależności pomiędzy ilością mRNA w cytoplazmie i SG. W niniejszej pracy natomiast u łubinu wykazano korelację pomiędzy zmniejszającą się ilością poli(A) RNA w cytoplazmie a wzrostem ilości SG podczas trwania hipoksji. Podobne obserwacje uzyskano także w pomiarach ilościowych poziomu mRNA RPB1. Zatem otrzymane wyniki w korzeniach łubinu podczas hipoksji dowodzą, że transkrypty w SG pochodzą z cytoplazmy.

Obecnie główną funkcję SG upatruje się w selektywnej regulacji translacji oraz w przechowywaniu mRNA, który może być wykorzystany po okresie stresu (Kearly i wsp., 2021). Zarówno u zwierząt i roślin obserwowano współzależność pomiędzy rozpadem SG a wzrostem ilości transkryptów na rybosomach. U *A. thaliana* wykazano, że po zakończeniu hipoksji wiele transkryptów rezydujących w SG odnajdywanych było na rybosomach (Sorenson i Bailey-Serres, 2014). Wyniki wskazują na funkcję przechowywania mRNA w SG na okres po zakończeniu stresu. Czas ekspresji wielu genów niezbędnych po zakończeniu wpływu niekorzystnych warunków środowiskach mógłby wówczas ulec skróceniu, ponieważ omijany byłby etap transkrypcji i dojrzewania mRNA. Uzyskane wyniki w korzeniach łubinu podtrzymują tę hipotezę, ponieważ wykazują wysoki wzrost poziomu poli(A) RNA w cytoplazmie po zakończeniu hipoksji. Taką tendencję obserwowano także w przypadku pomiarów ilości wszystkich poszczególnych transkryptów po ustąpieniu stresu. Dodatkowo dla RPB1 ilość w cytoplazmie po ponownym natlenieniu jest niemal sumą poziomów tych mRNA występujących w cytoplazmie i SG podczas hipoksji. Jednakże zarówno u roślin, jak i u zwierząt, nie była brana pod uwagę transkrypcja jądrowa w procesie zwiększonej ilości transkryptów po rozpadzie SG. Tymczasem z badań Niedojadło i wsp. (2016) wynika, że poziom transkrypcji po zakończeniu niedotlenienia u łubinu rośnie i jest nawet wyższy, niż w warunkach kontrolnych. To może być jednym z powodów wzrostu ilości mRNA w cytoplazmie po zakończeniu stresu. Aby uwzględnić to zjawisko zastosowano inhibitor transportu

jądrowo - cytoplazmatycznego LMB w celu wyeliminowania obecności w cytoplazmie nowo transkrybowanego RNA po usunięciu stresu. Prowadziło to do spodziewanego wzrostu ilości mRNA w jądrze komórkowym. Następował także wzrost ilości transkryptów w cytoplazmie, przy jednoczesnym demontażu SG. Wskazuje to na udział transkryptomu SG w pierwszych etapach ekspresji genów po hipoksji. Dokonano także pomiarów masy i długości korzeni po zadziałaniu LMB. Wykazano, że wzrost obu badanych parametrów po sześciu godzinach ponownego natlenienia w porównaniu do hipoksji. Oznacza to, że przy braku nowych transkryptów przez pierwsze godziny po ustąpieniu stresu ilość mRNA pochodzących z SG i cytoplazmy jest wystarczająca do wzrostu siewek. Interesującym wydaje się porównanie tego eksperymentu z wynikami uzyskanymi z korzeni traktowanych inhibitorami syntezy białka. W tym doświadczeniu zatrzymanie translacji od razu negatywnie wpływało na wzrost i masę korzeni. Dowodzi to niezbędnej szybkiej syntezy białka na dostępnym mRNA dla regeneracji organizmu roślinnego po stresie hipoksji. Powyższe wyniki badań wskazują, że SG są głównym źródłem mRNA dla maszyny translacyjnej podczas pierwszych godzin trwania reoksygenacji.

6.3 CHARAKTERYSTYKA CIAŁ DWUSTREFOWYCH JAKO NOWEGO TYPU CIAŁ STRESOWYCH U ROŚLIN

W korzeniach łubinu poddanego stresowi hipoksji obserwowano niejednolite strukturalnie ciała stresowe. Analiza ultrastrukturalna wykazała, że składają się z dwóch stref: pierścienia oraz części centralnej. Pierwszy z nich utworzony jest z gęsto zwiniętych włókien tworzących zewnętrzną strefę, natomiast drugi jaśniejszy wypełnia środek SG. W pierścieniu wykazano obecność białek PAB2 oraz poli(A) RNA, natomiast w strefie centralnej obecne są rybosomy. Obecność poli(A) RNA w pierścieniu potwierdzono stosując mikroskopię wysokorozdzielczą STORM. W obu obszarach wykryto natomiast także różne typy mRNA. Otrzymane wyniki jasno wskazują, że u *L. angustifolius* podczas stresu hipoksji występują nieopisane dotąd u roślin dwustrefowe ciała stresowe.

Ta niespotykana morfologia może mieć istotne znaczenie funkcjonalne, na co wskazuje różna dystrybucja molekuł w obu częściach SG. Obecność w pierścieniu poli(A) RNA i PAB2 wskazuje na występowanie w tym obszarze 3' końca mRNA. Natomiast zastosowanie sond do środkowych obszarów L37, L44 HUP7 i RPBI mRNA wykazało obecność tych fragmentów dość jednolicie w całej strukturze. Podjęto próbę lokalizacji 5' końców mRNA. To zadanie okazało się trudne technicznie i uzyskano pozytywne rezultaty tylko dla *RPBI* i *HUP7* mRNA. Prawdopodobnie wynika to z silnej asocjacji białek, na przykład CBP (z ang. cup binding protein), czy innych związanych z modyfikacją końca 5'. Dla obu badanych transkryptów

koniec 5' występował tylko w pierścieniu SG. Otrzymane wyniki wykazały, że koniec 3' mRNA występuje w pierścieniu, fragment środkowy czterech mRNA w centrum a koniec 5' dwóch badanych transkryptów także w pierścieniu. Jest to dość niezwykle ułożenie cząsteczek mRNA w tej strukturze. O podobnej dystrybucji RNA donoszono w paraspeckles u zwierząt (Clemson i wsp., 2009). Jest to ciało jądrowe związane z odpowiedzią na stres, retencją RNA w jądrze komórkowym, czy procesem karcynogenezy (Wang i Chen, 2020). W strukturze tej ważną rolę odgrywa transkrypt NEAT1_2, który jest długim niekodującym, uznawanym za szkieletowy RNA. Jego dystrybucja jest bardzo specyficzna, a mianowicie końce 5' i 3' są ułożone w peryferycznej części a fragment środkowy w centralnej części paraspeckles. Obecnie uważa się, że takie ułożenie jest odpowiedzialne za integrację tej struktury a brak środkowej części transkryptu powoduje rozpad paraspeckles. Wykazano także, że właśnie ten fragment po połączeniu z białkami odpowiada za separację faz i powstawanie tej struktury. Układ cząsteczek NEAT1_2 jest podobny, jak wykazano dla transkryptów w SG. Jednakże NEAT1_2 w paraspeckles jest RNA niekodującym i pełni raczej funkcję strukturalną a obecne w SG u łubinu RPB1 i HUP7 kodują białka pełniące odpowiednio funkcje w transkrypcji i odpowiedzi na stres niedotlenienia. Dlatego wydaje się, że pomimo podobnego ułożenia transkryptów w obu strukturach, w SG może ono pełnić inną funkcję. Wiadomym jest jednak z badań komórek zwierzęcych, że struktura RNA w SG ma ważne znaczenie dla funkcjonowania i biogenezy tych struktur. W SG odnajdywano raczej dłuższe RNA o liniowej formie, co ma ułatwiać kontakt z innymi RNA i białkami (Van Treeck i wsp., 2018). Jednak czy przedstawiony wyżej układ transkryptów w SG u łubinu sprzyja takim asocjacji wymaga dalszych badań i wyjaśnienia w przyszłości.

W centralnej części dwustrefowych ciał stresowych u łubinu występują rybosomy, na co wskazuje obecność 18 i 26S rRNA oraz obserwacje ultrastrukturalne. U badanego gatunku obserwowano także wyższy poziom 26S rRNA w otaczającej SG cytoplazmie. U zwierząt opublikowano podobne wyniki (Reineke i wsp., 2012). Może to wskazywać na rozpad rybosomu w tym obszarze, ponieważ w SG wykryto tylko małą podjednostkę. Jednak do tej pory nie prowadzono takich badań w komórkach roślinnych. Wyniki niniejszej pracy wskazują na możliwość zachodzenia takiego zjawisko u łubinu podczas stresu hipoksji. Należy zaznaczyć, że zarówno 18S i 26S rRNA występował na bardzo niskim poziomie w pierścieniu, aczkolwiek względna ilość rRNA występującego w małej podjednostce była wyższa.

Obecność rybosomów w centralnej części SG stawia pytanie, czy mogą być one aktywne translacyjnie i z jakimi mRNA mogą być połączone. W przypadku łubinu w środkowej strefie SG występuje głównie mRNA ADH1. Wszystkie sondy do tego transkryptu pokazywały

taką samą lokalizację. ADH1 jest białkiem biorącym udział w fermentacji alkoholowej, która jest niezbędna do regeneracji NADH biorącego udział w glikolizie. Poziom ekspresowania tego genu jest jednym z najwyższych podczas hipoksji (Mustroph i wsp., 2009). Ilość mRNA ADH1 silnie wzrastała u łubinu, na co wskazywały wyniki qPCR, RNA-seq a także hybrydyzacji *in situ*. Zatem możliwy jest wysoki poziom translacji tego białka nie tylko w cytoplazmie ale także w centralnej strefie SG. Byłoby to dość zaskakujące, tym bardziej, że dość powszechnie uważa się, że w SG występuje mRNA odłączony od rybosomów i nie ulegający translacji (Maruri-López i wsp., 2021; Kearly i wsp., 2024). Na możliwość zachodzenia syntezy białka w SG wskazują wyniki prac Mateju i wsp. (2020) prowadzonych na komórkach zwierząt. W SG mogą być obecne transkrypty będące w stadium inicjacji elongacji, czy terminacji translacji. Pokazano także, że mRNA stanowiące matrycę w syntezie białka są bardziej dynamiczne, niż nietranslatowane i mogą przemieszczać pomiędzy SG i cytoplazmą w obu kierunkach. Wyniki te wskazują, że same środowisko SG nie powoduje zahamowania syntezy białka. W korzeniach łubinu SG mogą nawet sprzyjać translacji, ponieważ w części centralnej obecne są składające się z obu podjednostek rybosomy. Zatem, czy na wszystkich mRNA może być prowadzona synteza białka podczas hipoksji w SG? Wydaje się, że tym co różnicuje możliwość translacji transkryptów u roślin może być ich ułożenie w tej strukturze. Tylko mRNA ADH1 jest całkowicie ułożony w centralnej części SG. Z kolei w przypadku pozostałych mRNA, środkowe fragmenty, mogą występować w obu strefach SG. Natomiast końce 5' i 3' tych transkryptów są umocowane w pierścieniu, gdzie nie ma rybosomów. Zakotwiczenie końców transkryptu w miejscu gdzie brak jest rybosomów uniemożliwia zainicjowanie procesu translacji. Podsumowując, uzyskane wyniki dowodzą, że dwustrefowość ciał stresowych u roślin może mieć znacznie funkcjonalne. Potencjowanie taki rozkład molekuł, w tym mRNA, może mieć związek z dostępnością sekwencji dla interakcji z białkami, czy innymi transkryptami. Dodatkowo ujawniono możliwość strukturalnej regulacji procesu translacji różnych mRNA w obrębie SG. Jednakże udział tego mechanizmu w tym procesie pozostaje kwestią otwartą i wymaga dalszych badań w przyszłości.

6.4 UDZIAŁ M6A W ODPOWIEDZI NA STRES NIEDOTLENIENIA ORAZ BIOGENEZĘ SGS U ROŚLIN

W warunkach niedotlenienia w komórkach korzeni łubinu zaobserwowano wzrost ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w regulację modyfikacji m6A. Znacząco zwiększyła się ekspresja genów kompleksu metylującego MTA, HAKAI, jak i jednej z demetylaz, ALKBH9B. Sprawdzone, czy ma to swoje odbicie w zmianach poziomu m6A

zarówno *in situ*, jak i w całym transkryptomie. W komórkach korzeni łubinu nastąpił wzrost ilości m6A w cytoplazmie podczas stresu hipoksji. Obserwowano także obecność tej modyfikacji w SG. Wskazuje to, że m6A bierze udział w odpowiedzi na stres niedotlenienia na poziomie struktur komórkowych. Należy przy tym zaznaczyć, że m6A pomimo tego, że występuje głównie w mRNA, w pewnej ilości może także być obecne w rRNA (Roundtree i wsp., 2017). Dlatego też podjęto kolejne badania które były prowadzone na poli(A) RNA, bądź na poszczególnych mRNA.

Zastosowanie techniki MetRNA-seq pozwoliło na sprawdzenie rozmieszczenia i poziomu m6A oraz odniesienie do poziomu ekspresji genów podczas hipoksji. Wykazano negatywną korelację pomiędzy ilością m6A a poziomem mRNA, co może być związane z dystrybucją tej modyfikacji w obrębie transkryptów. W wielu badaniach, zarówno na roślinach, jak i innych eukariontach, wykazano, że w m6A wzbogacane jest mRNA głównie w obszarze 3'UTR i w pobliżu kodonu STOP, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i stresowych. Rozkład ten jest silnie konserwowany między organizmami (Hu i wsp., 2022). N6-metyloadenozyna w tych regionach pełni funkcję stabilizującą transkrypty (Luo i wsp. 2020; Hou i wsp. 2021; Hu i wsp. 2022). Wyniki uzyskane u łubinu potwierdzają powyższe obserwacje. Interesujące jest, że po sześciu godzinach niedotlenienia zaobserwowano nieznaczny wzrost poziomu m6A w obrębie 3'UTR i kodonu STOP transkryptów, a następnie jego zmniejszenie po piętnastu godzinach stresu. Co więcej miało to przełożenie na korelację pomiędzy wzbogacaniem, a stabilizacją transkryptów. Zwiększenie poziomu modyfikacji w obszarze odpowiedzialnym za stabilizację w szóstej godzinie hipoksji, skutkowało dysproporcją w ilości genów o wysoce obniżonej ekspresji. Więcej genów o niskim wzbogaceniu w m6A charakteryzowało się znacznym spadkiem ekspresji, niż tych o wysokim wzbogaceniu. Natomiast gdy zmieniła się dystrybucja m6A w transkryptach po piętnastu godzinach hipoksji, wszystkie geny, niezależnie od stopnia obniżenia ekspresji, wykazywały zbliżony poziom wzbogacenia.

Niemniej jednak globalne analizy wykazywały opisany wyżej trend ale o nieznacznym stopniu. Może to wskazywać na dużą zmienność wśród pojedynczych transkryptów. Potwierdzają to wyniki uzyskane u *A. thaliana* ujawniające, że różnice w regulacji stabilności mRNA kierowanej przez m6A zależne były między innymi od funkcji metylowanych genów, udziału poszczególnych białek kompleksu metylującego, a także etapu rozwoju (Anderson i wsp., 2018; Hu i wsp., 2021; Shen i wsp., 2016). Otrzymane wyniki u łubinu potwierdzają tą hipotezę ponieważ wykazano istotną różnicę w poziomie m6A pomiędzy genami związanymi i niezwiązanymi z odpowiedzią na hipoksję. Ujawniono techniką meRIP-RT-qPCR, że

transkrypty których ekspresja wzrosła, miały niski poziom m6A i odwrotnie mRNA, którego ilość spadała podczas stresu charakteryzowały się wyższym poziomem tej modyfikacji. Prezentowane wyniki dotyczyły jednakże poszczególnych mRNA izolowanych z całych korzeni, dlatego w kolejnym etapie badań podjęto próbę powiązania otrzymanych wyników dotyczących poziomu ekspresji i m6A z miejscem ich występowania w komórce, ze szczególnym uwzględnieniem SG.

Wykazano odmienną lokalizację badanych transkryptów w SG. Obserwowany także m6A w granulach stresowych oraz powszechność tej modyfikacji skłania do zadania pytania o selektywność gromadzenia metylowanych transkryptów w SG. Ries i wsp. (2019) wykazali, że poziom m6A w mRNA izolowanych z SG komórek zwierzęcych był około 50% wyższy niż w całkowitym RNA. Nie wszystkie gromadzone w SG transkrypty u łubinu cechowały się jednak wysokim poziomem m6A. Przykładem jest gen odpowiedzi na stres, *HUP7*, którego transkrypt również był obecny w SG, mimo braku wyraźnie podwyższonego poziomu metylacji adenozy. Wiadomym jest, że niezależnie od pełnionej funkcji, RNA może być akumulowane w SG (Tong i wsp., 2022). Obecność transkryptów *HUP7* w SG może wynikać z ich dużej ilości w cytoplazmie. Wykazano, że lokalne wysokie stężenie RNA może wyzwać montaż SG (Campos-Melo i wsp. 2021). Wysoka aktywność transkrypcyjna *HUP7* mogłaby prowadzić do zwiększonego poziomu mRNA w cytoplazmie, co skutkowałoby ich rekrutacją do SG. Z drugiej jednak strony, transkrypty *ADHI*, mimo ich wysokiej, choć niższej niż *HUP7*, ekspresji nie były obecne w SG. Jednakże w warunkach stresowych, nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian poziomu metylacji adenozy w mRNA *ADHI* w odniesieniu do warunków kontrolnych. Wskazuje to, że większe znaczenie w selektywnej sekwestracji mRNA w SG u roślin może mieć wzrost poziomu m6A w odpowiedzi na stres, a nie sam wyjściowy poziom tej modyfikacji.

N6-metyloadenozyne może być związana z powstawaniem granul stresowych oraz sekwestracją mRNA, co potwierdza m.in. obecność białka rozpoznającego m6A, ECT2, w tych strukturach podczas niedotlenienia u *A. thaliana*. W komórkach ludzkich zarówno m6A RNA, jak i białka je rozpoznające gromadzą się w SG (Fu i Zhuang, 2020). Wykazano również wzajemną zależność między obecnością białek z domeną YTH w SG a obecnością m6A RNA w tych strukturach, sugerując ich udział w kierowaniu metylowanych mRNA do granul stresowych (Anders i wsp., 2018; Ries i wsp., 2019). U roślin białko ECT2, głównie cytoplazmatyczne, przemieszcza się do SG w warunkach stresu cieplnego, gdzie tworzy kompleksy z m6A RNA (Scutenaire i wsp., 2018). Uzyskane wyniki niniejszej pracy po raz pierwszy wskazują na podobny mechanizm u roślin. U mieszańca ABI3:MTA x ECT2-GFP o

obniżonym poziomie metylacji m6A o ponad 85%, białko ECT2 nie akumulowało w granulach stresowych. Jednocześnie średni poziom poli(A) RNA w tych strukturach był o 20% niższy w porównaniu do typu dzikiego. Wskazuje to, że ECT2 może przemieszczać się do granul stresowych wyłącznie w kompleksie z RNA zawierającym m6A, a więc m6A odgrywa bezpośrednią rolę w gromadzeniu przynajmniej pewnej części mRNA w SG.

Interakcja białek z domeną YTH oraz wysoce metylowanych mRNA promuje proces separacji fazowej (LLPS), co może odgrywać kluczową rolę w tworzeniu SG (Ries i wsp., 2019; Gao i wsp., 2019; Wang i wsp., 2020). U mieszańca ABI3:MTA x Rpb747b-GFP obniżony poziom metylacji skutkowało zmniejszeniem liczby SG w komórkach korzeni *A. thaliana* o około 40%. Dodatkowo badania lokalizacji m6A ujawniły, że stosunkowo wysoki poziom m6A w SG u łubinu zmniejsza się w miarę przedłużania warunków stresowych. Podobnie, u *A. thaliana* nie zaobserwowano akumulacji m6A w SG podczas długotrwałego, trzydniowego niedotlenienia. Interesujące jest jednak to, że białko ECT2, które nie gromadziło się w SG u mutantu o niskim poziomie metylacji adenozyiny, pomimo braku akumulacji m6A w SG było obecne w tych strukturach u typu dzikiego w trzecim dniu niedotlenienia. Sugeruje to, że obecność m6A RNA w początkowych etapach formowania SG jest kluczowa dla rekrutacji ECT2. Powyższe wyniki jednoznacznie wskazują, że N6-metyloadenozyina odgrywa istotną rolę w tworzeniu i składzie SG u roślin podczas pierwszych etapów ich montażu.

Dalszych badań wymaga natomiast zaobserwowany spadek ilości m6A w SG podczas stresu, choć ostatnie wyniki Fan i wsp. (2023) mogą wskazywać na potencjalny mechanizm tego zjawiska. Wykazano, że transpozon RNA Onsen, na skutek metylacji adenozyiny, jest transportowany do SG zawierających demetylazę ALKBH9B podczas stresu biotycznego. Autorzy sugerują funkcję m6A w mechanizmie tłumienia ruchliwości transpozonów, który obejmuje sekwestrację RNA transpozonu w SG. Obecność aktywnego ALKBH9B w SG wyjaśniałoby spadek ilości m6A w SG, który obserwowano w kolejnych etapach stresu niedotlenienia u łubinu. Jednakże Fan i wsp. (2023) nie ujawniają obniżenia poziomu m6A w SG w miarę trwania stresu biotycznego,

Uzyskane wyniki prezentowanej dysertacji wskazują na udział m6A w odpowiedzi na stres hipoksji. Może on być związany zarówno z regulacją, w tym obniżeniem ilości mRNA ale także z przechowywaniem transkryptów na okres po zakończeniu stresu. Te dwa zjawiska mogą odbywać się równocześnie ale w różnych rejonach komórki. Wykazano w pracy spadkowi ilości pewnych mRNA towarzyszy wzrost poziomu m6A w hipoksji. Jak pokazały wyniki uzyskane technikami *in situ* zjawisko to występuje głównie w cytoplazmie. Sugeruje to efektywniejsze działanie nukleaz na RNA zawierających m6A. W prezentowanej dysertacji

ujawniono także, że w pierwszych etapach hipoksji w SG znajduje się RNA z modyfikacją m6A. Natomiast u mutantu *A. thaliana* o obniżonej ilości m6A wykazano zmniejszenie poziomu poli(A) RNA w SG. Wynika z tego, że m6A jest konieczne dla rekrutacji części mRNA do granul stresowych. Jednak w celu ochrony mRNA przed degradacją w tych strukturach na późniejszych etapach stresu, ALKBH9B może demetylować transkrypty. Dane RNA-seq wspierają ten mechanizm u łubinu ujawniając wzrost aktywności homologu tego genu w stresie niedotlenienia. Dodatkowo SG są jednym miejsc w komórce, gdzie obserwowano spadek poziomu m6A podczas hipoksji u łubinu. Tak przechowany mRNA w SG jest wykorzystywany po zakończeniu stresu do szybkiej translacji. Wynika z tego, że rola m6A w odpowiedzi na stres hipoksji u roślin jest bardzo złożona. Wraz z mechanizmami które podczas transkrypcji metylują adenozyne w pozycji 6 oraz działania demetylaz ważnym aspektem w funkcjonowaniu tej modyfikacji jest lokalizacja komórkowa poszczególnych mRNA.

LITERATURA

Agarwal T, Ray S (2020) Casein Kinase2 and Its Dynamism in Abiotic Stress Management. *Protein Kinases and Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Perspective*. 310-346.

Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, Liu XH, Tavazoie S, Tavazoie S (2015) HNRNPA2B1 is a mediator of m6A- dependent nuclear RNA processing events. *Cell*. 162:1299–308.

Amara U, Hu J, Cai J, Kang H (2023) FLK is an mRNA m6 A reader that regulates floral transition by modulating the stability and splicing of FLC in Arabidopsis. *Mol Plant*. 16: 919–929.

Anderson P, Kedersha N (2009) Stress granules. *Curr Biol*. 19: R397–R398.

Anderson SJ, Kramer MC, Gosai SJ, Yu X, Vandivier LE, Nelson ADL, Anderson ZD, Beilstein MA, Fray RG, Lyons E, Gregory BD (2018) N6-Methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in Arabidopsis. *Cell Reports*. 25(5):1146–1157.e3.

Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Ao Q, Qiu T, Liao F, Hu Z, Yang Y (2023) Knockout of SIYTH2, encoding a YTH domain-containing protein, caused plant dwarfing, delayed fruit internal ripening, and increased seed abortion rate in tomato. *Plant Sci*. 335:111807

Arguello AE, DeLiberto AN, Kleiner RE (2017) RNA chemical proteomics reveals the N6-methyladenosine (m6A)-regulated protein–RNA interactome. *J Am Chem Soc*. 139:17249–17252

Armstrong W (1980) Aeration in higher plants. In: *Advances in Botanical Research*. Academic Press, 7:225–332.

Arribas-Hernández L, Brodersen P (2020) Occurrence and functions of m6A and other covalent modifications in plant mRNA. *Plant Physiology*. 182(1):79–96.

Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen MH, Poulsen C, Erdmann S, Brodersen P (2018) An m6A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 30(5):952–967.

Arribas-Hernández L, Rennie S, Schon M, Porcelli C, Enugutti B, Andersson R, Nodine M, Brodersen P (2021) The YTHDF proteins ECT2 and ECT3 bind largely overlapping target sets and influence target mRNA abundance, not alternative polyadenylation. *ELife*. 10.

Arribas-Hernández L, Simonini S, Hansen MH, Paredes EB, Bressendorff S, Dong Y, Østergaard L, Brodersen P (2020) Recurrent requirement for the m6A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis. *Development*. 147(14).

Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ (1988) Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Molecular and Cellular Biology*. 8:5059–5071

Bailey-Serres J, Voeselek LACJ (2008) Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*. 59:313–339.

Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK (2017) Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18:285–298.

Baymiller M, Moon SL (2023) Stress granules as causes and consequences of translation suppression. *Antioxidants & Redox Signaling*. 39(4–6):390–409.

hasin H, Hülskamp M (2017) ANGUSTIFOLIA, a plant homolog of CtBP/BARS localizes to stress granules and regulates their formation. *Frontiers in Plant Science*. 8:1004.

Bhat SS, Bielewicz D, Gulanicz T, Bodi Z, Yu X, Anderson SJ, Szweykowska-Kulinska Z (2020) mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m6A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(35):21785–21795.

Boccaletto P, Machnicka M, Purta E, Piątkowski P, Bagiński B, Wirecki T, de Crecy-Lagard V, Ross R, Limbach PA, Kotter A, Helm M, Bujnicki JM (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*. 46:D303–D307.

Bodi Z, Zhong S, Mehra S, Song J, Graham N, Li H, May S, Fray RG (2012) Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Frontiers in Plant Science*. 3:48.

Bramley H, Tyerman SD, Turner DW, Turner NC (2011) Root growth of lupins is more sensitive to waterlogging than wheat. *Functional Plant Biology*. 38:910–918.

- Buchan JR, Muhlrاد D, Parker R (2008) P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 183:441–455
- Bujnicki JM, Feder M, Radlinska M, Blumenthal RM (2002) Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA: m6A methyltransferase. *Journal of Molecular Evolution*. 55:431–444.
- Yan C, Yan Z, Wang Y, Yan X, Han Y (2014) Tudor-SN, a component of stress granules, regulates growth under salt stress by modulating GA20ox3 mRNA levels in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 65 5933–5944.
- Cai L, Cui S, Jin T, Huang X, Hou H, Hao B, Xu Z, Cai L, Hu Y, Yang X, et al. 2023. The N6 -methyladenosine binding proteins YTH03/05/ 10 coordinately regulate rice plant height. *Plant Sci* 329: 111546. doi:10.1016/j.plantsci.2022.111546
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 10:421.
- Campos-Melo D, Hawley ZCE, Droppelmann CS, Strong MJ (2021) The integral role of RNA in stress granule formation and function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9:621779.
- Litholdo CG, Bousquet-Antonelli C (2019) Chemical RNA Modifications: The Plant Epitranscriptome. *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, Springer International Publishing, pp.291-310
- Chantarachot T, Bailey-Serres J (2018) Polysomes, stress granules, and processing bodies: A dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function. *Plant Physiology*. 176:254–269.
- Chantarachot T, Sorenson RS, Hummel M, Ke H, Kettenburg AT, Chen D et al. (2020) DHH1/DDX6-like RNA helicases maintain ephemeral half-lives of stress-response mRNAs. *Nature Plants*. 6:675–685.
- Chen X, Ding Y, Yang Y, Song C, Wang B, Yang S, Guo Y, Gong Z (2021) Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. *Journal of Integrative Plant Biology*. 63:53–78.

Cheng P, Bao S, Li C, Tong J, Shen L, Yu H (2022) RNA N6-methyladenosine modification promotes auxin biosynthesis required for male meiosis in rice. *Developmental Cell*. 57:246259.e4

Chuong NN, Doan PPT, Wang L, Kim JH, Kim J (2023) Current insights into m6A RNA methylation and its emerging role in plant circadian clock. *Plants*. 12(3):624.

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB (2009) An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Molecular Cell*. 33(6):717–726.

Collier NC, Schlesinger MJ (1986) The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *Journal of Cell Biology*. 103:1495–1507. doi:10.1083/jcb.103.4.1495.

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6(11):850–861.

Dat J, Folzer H, Parent C, Badot PM, Capelli N (2006) Hypoxia stress: current understanding and perspectives. *Environmental and Experimental Botany*. 57:301–313.

Desrosiers R, Friderici K, Rottman F (1974) Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 71(10):3971–3975.

Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 489(7414):101–108.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 29(1):15–21.

Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S et al. (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*. 485:201.

Drew MC (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:223–250.

Du H, Zhao Y, He JQ, Zhang Y, Xi HR, Liu MF, Ma JB, Wu LG (2016) YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nature Communications*. 7:11.

Duan HC, Wei LH, Zhang C, Wang Y, Chen L, Lu Z, Chen PR, He C, Jia G (2017) ALKBH10B is an RNA N6-methyladenosine demethylase affecting Arabidopsis floral transition. *Plant Cell*. 29:2995–3011.

Fan W, Wang L, Lei Z, Li H, Chu J, Yan M, Wang Y, Wang H, Yang J, Cho J (2023) m6A RNA demethylase AtALKBH9B promotes mobilization of a heat-activated long terminal repeat retrotransposon in Arabidopsis. *Science Advances*. 9(48):eadf3292.

Fernandez Rodriguez G, Cesaro B, Fatica A (2022) Multiple roles of m6A RNA modification in translational regulation in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(16):8971.

Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M et al. (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 478(7369):337–342.

Fu Y, Zhuang X (2020) m6A-binding YTHDF proteins promote stress granule formation. *Nature Chemical Biology*. 16(9):955–963.

Fukao T, Harris T, Bailey-Serres J (2009) Evolutionary analysis of the Sub1 gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice. *Annals of Botany*. 103:143–150.

Gao Y, Pei G, Li D, Li R, Shao Y, Zhang QC, Li P (2019) Multivalent m6A motifs promote phase separation of YTHDF proteins. *Cell Research*. 29:767–769.

Geigenberger P (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:247–256.

Govindan G, Sharma B, Li YF, Armstrong CD, Merum P, Rohila JS, Gregory BD, Sunkar R (2022) mRNA N6-methyladenosine is critical for cold tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 111(4):1052–1068.

Gravot A, Richard G, Lime T, Lemarié S, Jubault M, Lariagon C et al. (2016) Hypoxia response in Arabidopsis roots infected by *Plasmodiophora brassicae* supports the development of clubroot. *BMC Plant Biology*. 16:1–10.

Guo T, Liu C, Meng F, Hu L, Fu X, Yang Z et al. (2022) The m6A reader MhYTP2 regulates MdMLO19 mRNA stability and antioxidant genes translation efficiency conferring powdery mildew resistance in apple. *Plant Biotechnology Journal*. 20:511–525.

Gutierrez-Beltran E, Elander PH, Dalman K, Dayhoff GW, Moschou PN, Uversky VN, Crespo JL, Bozhkov PV (2021) Tudor staphylococcal nuclease is a docking platform for stress granule components and is essential for SnRK1 activation in Arabidopsis. *The EMBO Journal*. 40(17):e105043.

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M et al. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. 8:1494–1512.

Hamada T, Yako M, Minegishi M, Sato M, Kamei Y, Yanagawa Y, Hara-Nishimura I (2018) Stress granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in Arabidopsis. *Journal of Cell Science*. 131:jcs216051.

Hammer Ø, Harper DAT (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1):1.

Han R, Shoaib Y, Cai J, Kang H (2023) ALKBH10B-mediated m6A demethylation is crucial for drought tolerance by affecting mRNA stability in Arabidopsis. *Environmental and Experimental Botany*. 209:105306.

Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H et al. (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*. 460:1026–1030.

Hofmann NR (2017) Epitranscriptomics and flowering: mRNA methylation/demethylation regulates flowering time. *The Plant Cell*. 29:2949–2950.

Hon CC, Ramilowski JA, Harshbarger J et al. (2017) An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*. 543(7644):199–204.

Hondele M, Sachdev R, Heinrich S, Wang J, Vallotton P, Fontoura BM et al. (2019) DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature*. 573:144–148.

Hou Y, Sun J, Wu B, Gao Y, Nie H, Nie Z, Quan S et al. (2021) CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m6A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in Arabidopsis. *Molecular Plant*. 14:688–699.

Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, Guo Y, Shi X, Liu Y et al. (2017) Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*. 27:1115–1127.

Hu J, Cai J, Park SJ, Lee K, Li Y, Chen Y et al. (2021) N6-methyladenosine mRNA methylation is important for salt stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 106:1759–1775.

Hu J, Cai J, Xu T, Kang H (2022) Epitranscriptomic mRNA modifications governing plant stress responses: underlying mechanism and potential application. *Plant biotechnology journal*. 20(12), 2245-2257.

Hu J, Manduzio S, Kang H (2019) Epitranscriptomic RNA methylation in plant development and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*. 10:500.

Huang H, Weng H, Sun W i wsp. (2018) Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*. 20:285–295.

Huang HL, Weng HY, Zhou KR i wsp. (2019) Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m6A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*. 567:414–419.

Huang C, Chen Y, Dai H i wsp. (2020) UBAP2L arginine methylation by PRMT1 modulates stress granule assembly. *Cell Death & Differentiation*. 27:227–241.

Huang HL, Weng HY, Sun WJ i wsp. (2018) Recognition of RNA N-6- methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat. Cell Biol*. 20, 285–295.

Hubstenberger A, Courel M, Benard M, Souquere S, Ernoult-Lange M, Chouaib R et al. (2017) P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons. *Molecular Cell*. 68:144.e5–157.e5.

Hussain S, Aleksic J, Blanco S, Dietmann S, Frye M (2013) Characterizing 5-methylcytosine in the mammalian epitranscriptome. *Genome Biology*. 14:1–10.

J. Tong, Z. Ren, L. Sun, S. Zhou, W. Yuan, Y. Hui, D. Ci, W. Wang, L.-M. Fan, Z. Wu, W. Qian, ALBA proteins confer thermotolerance through stabilizing HSF messenger RNAs in cytoplasmic granules, *Nat. Plants* 8 (2022) 778–791.

Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., and Parker, R. (2016). ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure. *Cell* 164, 487–498. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038

Jang, G. J., Yang, J. Y., Hsieh, H. L., & Wu, S. H. (2019). Processing bodies control the selective translation for optimal development of Arabidopsis young seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(13), 6451-6456.

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C. et al. (2011) N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 7, 885.

Jongman, B., Ward, P. J. & Aerts, J. C. J. H. Global exposure to river and coastal flooding: long term trends and changes. *Glob. Environ. Change* 22, 823–835 (2012).

Kearly, A., Nelson, A. D., Skirycz, A., & Chodasiewicz, M. (2024, March). Composition and function of stress granules and P-bodies in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 156, pp. 167-175). Academic Press.

Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P. 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257–1268.

Kedersha, N. A., & Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 963-969.

Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431–1442. doi: 10.1083/jcb.147.7.1431

Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., et al. (2016). G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *J. Cell Biol.* 212, 845–860.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., et al. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884. doi: 10.1083/jcb.200502088

Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H. T., Cosgrove, D., Fleming, A., ... & Voeselek, L. (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant molecular biology*, 55, 311-314.

Kennedy, T. D., and Lane, B. G. (1979). Wheat embryo ribonucleates. XIII. Methylsubstituted nucleoside constituents and 50-terminal dinucleotide sequences in bulk poly(A)-rich RNA from imbibing wheat embryos. *Can. J. Biochem.* 57,927–931. doi: 10.1139/o79-112

- Khong, A., Matheny, T., Huynh, T. N., Babl, V., & Parker, R. (2022). Limited effects of m6A modification on mRNA partitioning into stress granules. *Nature communications*, 13(1), 3735.
- Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S. F., Wheeler, J. R., and Parker, R. (2017). The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules. *Mol. Cell* 68, 808–820. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.015
- Kierzek, E., & Kierzek, R. (2003). The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N6-alkyladenosines and 2-methylthio-N6-alkyladenosines. *Nucleic Acids Research*, 31(15), 4472. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKKG633>
- Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, Jacob D, Kreim N, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation bybridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6Amachinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev.* 2018;32:415–29.
- Kosmacz, M., & Skirycz, A. (2020). The isolation of stress granules from plant material. *Current protocols in plant biology*, 5(3), e20118.
- Kosmacz, M., Gorka, M., Schmidt, S., Luzarowski, M., Moreno, J. C., Szlachetko, J., et al. (2019). Protein and metabolite composition of Arabidopsis stress granules. *New Phytol.* 222, 1420–1433. doi: 10.1111/nph.15690
- Kosmacz, M., Luzarowski, M., Kerber, O., Leniak, E., Gutiérrez-Beltrán, E., Moreno, J. C., et al. (2018). Interaction of 20 , 30-cAMP with Rbp47b plays a role in stress granule formation. *Plant Physiol.* 177, 411–421
- Kreuzwieser J, Hauberg J, Howell KA, Carroll A, Rennenberg H, MillarAH, Whelan J (2009) Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiol* 149: 461–473
- Langdon, E. M., Qiu, Y., Niaki, A. G., McLaughlin, G. A., Weidmann, C. A., Gerbich, T. M., et al. (2018). mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation. *Science* 360, 922–927. doi: 10.1126/science.aar7432
- Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics.* 2018 Jul 18. doi: 10.1093/bioinformatics/bty648.
- Le Gall H, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C. 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants (Basel)* 4, 112-166.

- Lee KW, Chen PW, Lu CA, Chen S, Ho TH, Yu SM (2009) Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci Signal* 2: ra61
- Lee, S. C., Mustrup, A., Sasidharan, R., Vashisht, D., Pedersen, O., Oosumi, T., ... & Bailey-Serres, J. (2011). Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytologist*, 190(2), 457-471.
- Lei, Z., Kim, E. Y., & Cho, J. (2021). Enrichment of cytoplasmic RNA granules from *Arabidopsis* seedlings. *Bio-protocol*, 11(21), e4212-e4212.
- Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 12, 1-16.
- Li CH, Ohn T, Ivanov P, Tisdale S, Anderson P. 2010. eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PloS one* 5, e9942.
- Li, A., Chen, Y.-S., Ping, X.-L., Yang, X., Xiao, W., Yang, Y., Sun, H.-Y., Zhu, Q., Baidya, P., Wang, X., et al. (2017). Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res.* 27: 444–447.
- Li, D.Y.; Zhang, H.J.; Hong, Y.B.; Huang, L.; Li, X.H.; Zhang, Y.F.; Ouyang, Z.G.; Song, F.M. Genome-wide identification, biochemical characterization, and expression analyses of the YTH domain-containing RNA-binding protein family in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2014, 32, 1169–1186.
- Liao S, Sun H, Xu C (2018) YTH Domain: A Family of N⁶-methyladenosine (m6A) Readers. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(2), 99–107.
- Lin, Y., Protter, D. S., Rosen, M. K., and Parker, R. (2015). Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Mol. Cell* 60, 208–219. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.018
- Liu N, Pan T (2016) N⁶-methyladenosine–encoded epitranscriptomics. *Nat Struct Mol Biol* 23:98–102. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3162>
- Liu, C., Mentzelopoulou, A., Hatzianestis, I. H., Tzagkarakis, E., Skaltsogiannis, V., Ma, X., ... & Moschou, P. N. (2024). A proxitome-RNA-capture approach reveals that processing bodies repress coregulated hub genes. *The Plant Cell*, 36(3), 559-584.

Liu, C., Sun, H., Yi, Y., Shen, W., Li, K., Xiao, Y., Li, F., Li, Y., Hou, Y., Lu, B., Liu, W., Meng, H., Peng, J., Yi, C., & Wang, J. (2022). Absolute quantification of single-base m6A methylation in the mammalian transcriptome using GLORI. *Nature Biotechnology* 2022 41:3, 41(3), 355–366. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01487-9>

Liu, N.A.; Zhou, K.I.; Parisien, M.; Dai, Q.; Diatchenko, L.; Pan, T. N-6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, 6051–6063.

Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 1-21

Luo, J., Wang, Y., Wang, M., Zhang, L., Peng, H., Zhou, Y., Jia, G. et al. (2020) Natural variation in RNA m6A methylation and its relationship with translational status. *Plant Physiol.* 182, 332–344.

Luo, J.-H., Wang, Y., Wang, M., Zhang, L.-Y., Peng, H.-R., Zhou, Y.-Y., Jia, G.-F., and He, Y. (2020). Natural variation in RNA m6A methylation and its relationship with translational status. *Plant Physiol.* 182: 332–344.

Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K. L., Mak, R., Jin, W., Fang, M. Y., et al. (2018). Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. *Cell* 172, 590–604. doi: 10.1016/j.cell.2017. 12.032

Martinez-Perez, M., Aparicio, F., Lopez-Gresa, M.P., Belles, J.M., Sanchez-Navarro, J.A. and Pallas, V. (2017) Arabidopsis m6A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m6A abundance in its genomic RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 10755–10760.

Martinez-Pérez, M., Gómez-Mena, C., Alvarado-Marchena, L., Nadi, R., Micol, J. L., Pallas, V., & Aparicio, F. (2021). The m6A RNA Demethylase ALKBH9B Plays a Critical Role for Vascular Movement of Alfalfa Mosaic Virus in Arabidopsis. *Frontiers in Microbiology*, 12, 745576. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.745576/FULL>

Martínez-Pérez, M., Gómez-Mena, C., Alvarado-Marchena, L., Nadi, R., Micol, J. L., Pallas, V., & Aparicio, F. (2021). The m6A RNA demethylase ALKBH9B plays a critical role for vascular movement of alfalfa mosaic virus in Arabidopsis. *Frontiers in Microbiology*, 12, 745576.

- Maruri-López, I., Figueroa, N. E., Hernández-Sánchez, I. E., & Chodasiewicz, M. (2021). Plant stress granules: trends and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 12, 722643.
- Mateju D, Eichenberger B, Voigt F, Eglinger J, Roth G, Chao JA. 2020. Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules. *Cell* 183, 1801-1812.
- McCue, A. D., Nuthikattu, S., Reeder, S. H., and Slotkin, R. K. (2012). Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS Genet.* 8:e1002474. doi: 10.1371/journal.pgen.1002474
- McLoughlin, F., Kim, M., Marshall, R. S., Vierstra, R. D., and Vierling, E. (2019). HSP101 interacts with the proteasome and promotes the clearance of ubiquitylated protein aggregates. *Plant Physiol.* 180, 1829–1847. doi: 10.1104/pp.19.00263
- Merret, R., Carpentier, M. C., Favory, J. J., Picart, C., Descombin, J., Bousquet- Antonelli, C., et al. (2017). Heat shock protein HSP101 affects the release of ribosomal protein mRNAs for recovery after heat shock. *Plant Physiol.* 174, 1216–1225. doi: 10.1104/pp.17.00269
- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., and Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635–1646. doi: 10.1016/j.cell.2012. 05.003
- Mielecki, D.; Zugaj, D.L.; Muszewska, A.; Piwowarski, J.; Chojnacka, A.; Mielecki, M.; Nieminuszczy, J.; Grynberg, M.; Grzesiuk, E. Novel AlkB dioxygenases-alternative models for in silico and in vivo studies. *PLoS ONE* 2012, 7, e30588.
- Mignolli, F., Todaro, J. S., & Vidoz, M. L. (2020). Internal aeration and respiration of submerged tomato hypocotyls are enhanced by ethylene-mediated aerenchyma formation and hypertrophy. *Physiologia plantarum*, 169(1), 49-63.
- Moser, J. J., & Fritzler, M. J. (2010). Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 828-843.
- Muench DG, Zhang C, Dahodwala M. 2012. Control of cytoplasmic translation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3, 178-194.
- Mustroph, A., Lee, S. C., Oosumi, T., Zanetti, M. E., Yang, H., Ma, K., ... & Bailey-Serres, J. (2010). Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiology*, 152(3), 1484-1500.

- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., ... & Bailey-Serres, J. (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18843-18848.
- Nguyen, C. C., Nakaminami, K., Matsui, A., Kobayashi, S., Kurihara, Y., Toyooka, K., et al. (2016). Oligouridylate binding protein 1b plays an integral role in plant heat stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 7:853.
- Nguyen, T. K. H., & Kang, H. (2024). Reading m6A marks in mRNA: A potent mechanism of gene regulation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*.
- Niedojadło, J., Deleńko, K., & Niedojadło, K. (2016). Regulation of poly (A) RNA retention in the nucleus as a survival strategy of plants during hypoxia. *RNA biology*, 13(5), 531-543.
- Niedojadło, J., Kubicka, E., Kalich, B., & Smoliński, D. J. (2014). Poly (A) RNAs including coding proteins RNAs occur in plant Cajal bodies. *PLoS One*, 9(11), e111780.
- Nishat, Z.S.; Hasan, M.S.; Islam, M.S.; Hossain, T.; Ghosh, A. Identification of epitranscriptomic methylation marker genes in Arabidopsis and their expression profiling in response to developmental, anatomical, and environmental modulations. *Curr. Plant Biol.* 2022, 30, 100247
- Nover, L., Scharf, K. D., & Neumann, D. (1983). Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Molecular and cellular biology*, 3(9), 1648-1655.
- Nover, L., Scharf, K. D., and Neumann, D. (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 9, 1298–1308. doi: 10.1128/mcb.9.3.1298-1308.1989
- Nunes, C., Mestre, I., Marcelo, A., Koppenol, R., Matos, C. A., and Nóbrega, C. (2019). MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules. *Database* 2019:baz031.
- P. Kanodia, P. Vijayapalani, R. Srivastava, R. Bi, P. Liu, W.A. Miller, S.H. Howell, Control of translation during the unfolded protein response in maize seedlings: Life without PERKs, *Plant Direct* 4 (2020), e00241

- Parker, M. T., Knop, K., Sherwood, A. V., Schurch, N. J., Mackinnon, K., Gould, P. D., et al. (2020). Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of Arabidopsis mRNA processing and m6A modification. *eLife* 9:e49658. doi: 10.7554/eLife.49658
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature biotechnology*, 33(3), 290-295.
- Protter, D. S., and Parker, R. (2016). Principles and properties of stress granules. *Trends Cell Biol.* 26, 668–679. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004
- Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., ... & Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic acids research*, 44(Web Server issue), W160.
- Reineke LC, Tsai W-C, Jain A, Kaelber JT, Jung SY, Lloyd RE. 2017. Casein kinase 2 is linked to stress granule dynamics through phosphorylation of the stress granule nucleating protein G3BP1. *Molecular and Cellular Biology* 37, e00596-16
- Reineke, L. C., Dougherty, J. D., Pierre, P., & Lloyd, R. E. (2012). Large G3BP-induced granules trigger eIF2 α phosphorylation. *Molecular biology of the cell*, 23(18), 3499-3510.
- Reuper, H., Amari, K., and Krenz, B. (2021). Analyzing the G3BP-like gene family of Arabidopsis thaliana in early turnip mosaic virus infection. *Sci. Rep.* 11:2187.
- Ries, R. J., Pickering, B. F., Poh, H. X., Namkoong, S., & Jaffrey, S. R. (2023). m6A governs length-dependent enrichment of mRNAs in stress granules. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30(10), 1525-1535.
- Ries, R.J., Zaccara, S., Klein, P. et al. m6A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature* 571, 424–428 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1374-1>
- Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2020). Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *J. Cell Sci.* 133:jcs242487.
- Roost, C., Lynch, S. R., Batista, P. J., Qu, K., Chang, H. Y., & Kool, E. T. (2015). Structure and Thermodynamics of N6-Methyladenosine in RNA: A Spring-Loaded Base Modification. *Journal of the American Chemical Society*, 137(5), 2107. <https://doi.org/10.1021/JA513080V>

- Rose, J. D., Maddry, J. A., Comber, R. N., Suling, W. J., Wilson, L. N., & Reynolds, R. C. (2002). Synthesis and biological evaluation of trehalose analogs as potential inhibitors of mycobacterial cell wall biosynthesis. *Carbohydrate research*, 337(2), 105-120.
- Rui Y, Dinneny JR. 2020. A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytologist* 225, 1428-1439.
- Ruzicka, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., Eeckhout, D., El-Showk, S., Li, H., Zhong, S., Jaeger, G. De, Mongan, N. P., Hejátko, J., Helariutta, Y., & Fray, R. G. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *The New Phytologist*, 215(1), 157. <https://doi.org/10.1111/NPH.14586>
- Ruzicka, K.; Zhang, M.; Campilho, A.; Bodi, Z.; Kashif, M.; Saleh, M.; Eeckhout, D.; El-Showk, S.; Li, H.Y.; Zhong, S.L.; et al. Identification of factors required for m6A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol.* 2017, 215, 157–172.
- S. Kwon, Y. Zhang, P. Matthias, The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response, *Genes Dev.* 21 (2007) 3381–3394.
- Saletore, Y., Meyer, K., Korlach, J., Vilfan, I. D., Jaffrey, S., & Mason, C. E. (2012). The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. *Genome biology*, 13, 1-12.
- Sanders, D. W., Kedersha, N., Lee, D. S., Strom, A. R., Drake, V., Riback, J. A., et al. (2020). Competing protein-RNA interaction networks control multiphase intracellular organization. *Cell* 181, 306–324. doi: 10.1016/j.cell.2020. 03.050
- Sasidharan, R., & Mustroph, A. (2011). Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. *The Plant Cell*, 23(12), 4173-4183.
- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., ... & Voesenek, L. A. (2017). Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. *New Phytologist*, 214(4), 1403-1407.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.

Scutenaire, J.; Deragon, J.M.; Jean, V.; Benhamed, M.; Raynaud, C.; Favory, J.J.; Merret, R.; Bousquet-Antonelli, C. The YTH domain protein ECT2 is an m6A reader required for normal trichome branching in Arabidopsis. *Plant Cell* 2018, 30, 986–1005

Shen L, Liang Z, Gu X et al (2016) N6-Methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in Arabidopsis. *Dev Cell* 38:186–200. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.008>

Shen L, Liang Z, Gu X, Chen Y, Teo ZW, Hou X, et al. N6-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in Arabidopsis. *Dev Cell*. 2016;38:186–200.

Shen, L., Liang, Z., Gu, X., Chen, Y., Teo, Z.W., Hou, X., Cai, W. et al. (2016) N6-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in Arabidopsis. *Dev. Cell*, 38, 186–200.

Shen, L., Ma, J., Li, P., Wu, Y., & Yu, H. (2023). Recent advances in the plant epitranscriptome. *Genome Biology*, 24(1), 43.

Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808. doi: 10.1126/science. 1082320

Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B.S., Ma, H., Hsu, P.J., Liu, C., and He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*. 27: 315–328.

Shim S, Lee HG, Lee H, Seo PJ. H3K36me2 is highly correlated with m6A modifications in plant. *J Integr Plant Biol*. 2020;62:1455–60.

Shoaib Y, Hu J, Manduzio S, Kang H. 2021. Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog 10B, an N6-methyladenosine mRNA demethylase, plays a role in salt stress and abscisic acid responses in Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* 173: 1078–1089. doi:10.1111/ppl.13505

Singh, K. B., Kamphuis, L. G., & Nelson, M. N. (Eds.). (2020). *The Lupin Genome*. Springer.

Song P, Tayier S, Cai Z, Jia G. 2021a. RNA methylation in mammalian development and cancer. *Cell Biol Toxicol* 37: 811–831. doi:10.1007/s10565-021-09627-8

Song P, Wei L, Chen Z, Cai Z, Lu Q, Wang C, Tian E, Jia G. 2023. m6A readers ECT2/ECT3/ECT4 enhance mRNA stability through direct recruitment of the poly(A) binding proteins in Arabidopsis. *Genome Biol* 24: 103. doi:10.1186/s13059-023-02947-4.

Song P, Yang J, Wang C, Lu Q, Shi L, Tayier S, Jia G. 2021b. Arabidopsis N6 -methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies. *Mol Plant* 14: 571–587. doi:10.1016/j.molp.2021 .01.014

Song, P., Cai, Z., & Jia, G. (2024). Principles, functions, and biological implications of m6A in plants. *RNA*, 30(5), 491-499.

Sorenson, R., & Bailey-Serres, J. (2014). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2373-2378.

Stawiński, S., & Grupa, I. H. A. R. (2016). Łubin wąskolistny–gatunek niewykorzystanych możliwości. *Agro Serwis*, 29-34.

Tang J, Yang J, Duan H, Jia G. 2021. ALKBH10B, an mRNA m6 A demethylase, modulates ABA response during seed germination in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 12: 712713. doi:10.3389/fpls.2021 .712713

Tang J, Yang J, Lu Q, Tang Q, Chen S, Jia G. 2022. The RNA N6-methyladenosine demethylase ALKBH9B modulates ABA responses in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* 64: 2361–2373. doi:10.1111/jipb .13394

Tegowski, M., Flamand, M. N., & Meyer, K. D. (2022). scDART-seq reveals distinct m6A signatures and mRNA methylation heterogeneity in single cells. *Molecular Cell*, 82(4), 868. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.12.038>

The Food and Agriculture Organization of the United Nations 2015: The impact of disasters on agriculture and food security. United Nations, 77 pp

Tong J, Ren Z, Sun L, et al. 2022. ALBA proteins confer thermotolerance through stabilizing HSF messenger RNAs in cytoplasmic granules. *Nature Plants* 8, 778-791.

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2014. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7, 562-578.

Tzafrir, I., Pena-Muralla, R., Dickerman, A., Berg, M., Rogers, R., Hutchens, S., Sweeney, T. C., McElver, J., Aux, G., Patton, D., & Meinke, D. (2004). Identification of Genes Required for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(3), 1206. <https://doi.org/10.1104/PP.104.045179>

- Vaahtera L, Schulz J, Hamann T. 2019. Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. *Nature Plants* 5, 924–932.
- Van Tran, N., Ernst, F. G. M., Hawley, B. R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., ... & Lafontaine, D. L. J. (2019). The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic acids research*, 47(15), 7719-7733.
- Van Treeck, B., and Parker, R. (2018). Emerging roles for intermolecular RNA-RNA interactions in RNP assemblies. *Cell* 174, 791–802. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.023
- Van Treeck, B., Protter, D. S., Matheny, T., Khong, A., Link, C. D., and Parker, R. (2018). RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2734–2739. doi: 10.1073/pnas.1800038115
- Wallace, E.W.J., Kear-Scott, J.L., Pilipenko, E.V., Schwartz, M.H., Laskowski, P.R., Rojek, A.E., Katanski, C.D., Riback, J.A., Dion, M.F., Franks, A.M., et al. (2015). Reversible, specific, active aggregates of endogenous proteins assemble upon heat stress. *Cell* 162, 1286–1298.
- Wang X, Lu ZK, Gomez A, Hon GC, Yue Y, et al. m6A- dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*. 2014;505:117–20.
- Wang, S., Wang, H., Xu, Z., Jiang, S., Shi, Y., Xie, H., Wang, S., Hua, J., and Wu, Y. (2023). m6A mRNA modification promotes chilling tolerance and modulates gene translation efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 192: 1466–1482.
- Wang, X., Zhao, B.S., Roundtree, I.A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., and He, C. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell* 161: 1388–1399.
- Wang, X.; Lu, Z.K.; Gomez, A.; Hon, G.C.; Yue, Y.N.; Han, D.L.; Fu, Y.; Parisien, M.; Dai, Q.; Jia, G.F.; et al. N-6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 2014, 505, 117–120
- Wang, Y., & Chen, L. L. (2020). Organization and function of paraspeckles. *Essays in biochemistry*, 64(6), 875-882.
- Wei LH, Song P, Wang Y, Lu Z, Tang Q, Yu Q, Xiao Y, Zhang X, Duan HC, Jia G. 2018. The m6 A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 30: 968–985. doi:10.1105/tpc.17.00934

Wheeler, J. R., Matheny, T., Jain, S., Abrisch, R., and Parker, R. (2016). Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife* 5:e18413.

Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4

Wilbertz, J. H., Voigt, F., Horvathova, I., Roth, G., Zhan, Y., and Chao, J. A. (2019). Single-molecule imaging of mRNA localization and regulation during the integrated stress response. *Mol. Cell* 73, 946–958. doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.006

Wolozin, B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 7, 1–12 (2012).

Wong, C. E., Zhang, S., Xu, T., Zhang, Y., Teo, Z. W. N., Yan, A., Shen, L., & Yu, H. (2023). Shaping the landscape of N6-methyladenosine RNA methylation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 191(3), 2045–2063. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAD010>

Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, Fu X, Liu S, Bo X, Yu G. 2021. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation* 2, 100141

Xing, W., Muhlrads, D., Parker, R., & Rosen, M. K. (2020). A quantitative inventory of yeast P body proteins reveals principles of composition and specificity. *Elife*, 9, e56525.

Xu C, Wu Z, Duan HC, Fang X, Jia G, Dean C. R-loop resolution promotes co-transcriptional chromatin silencing. *Nat Commun.* 2021;12:1790.

Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705–708.

Yates AD, Allen J, Amode RM, et al. 2022. Ensembl Genomes 2022: an expanding genome resource for non-vertebrates. *Nucleic Acids Research* 50, D996-D1003

Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D., Bashkurov, M., Chen, G. I., et al. (2018). High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies. *Mol. Cell* 69, 517–532. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.020

Yu J, Zhang Y, Zhong J, Ding H, Zheng X, Wang Z, Zhang Y. 2019. Water-level alterations modified nitrogen cycling across sediment–water interface in the Three Gorges Reservoir. *Environmental Science and Pollution Research International* 27, 25886–25898.

Yu X, Sharma B, Gregory BD (2021) The impact of epitranscriptomic marks on post-transcriptional regulation in plants. *Brief Funct Genomics* 20:113–124. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ela021>

Zampedri, C., Tinoco-Cuellar, M., Carrillo-Rosas, S., Diaz-Tellez, A., Ramos-Balderas, J. L., Pelegri, F., & Maldonado, E. (2016). Zebrafish P54 RNA helicases are cytoplasmic granule residents that are required for development and stress resilience. *Biology Open*, 5(10), 1473-1484.

Zemlyanskaya, E. A., Zemlianski, V., Pěňčík, A., Kelley, D., Helariutta, Y., Novák, O., & Růžička, K. (2023). N6-adenosine methylation of mRNA integrates multilevel auxin response and ground tissue development in *Arabidopsis*. *Development*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1242/dev.201775>

Zhang, J., Okabe, K., Tani, T., & Funatsu, T. (2011). Dynamic association–dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. *Journal of cell science*, 124(23), 4087-4095.

Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbø CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, et al. 2013. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell* 49: 18–29. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.015

Zhong SL, Li HY, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*. 2008;20:1278–88.

Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R. G. (2008). MTA is a *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *The Plant Cell*, 20(5), 1278–1288. <https://doi.org/10.1105/TPC.108.058883>

Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Jaffrey, S.R. and Qian, S.-B. (2015) Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* 526, 591.

Zid, B.M., and O'Shea, E.K. (2014). Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature* 514, 117–121.