

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

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 nieobłonione 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 epitranskryptomyczne, 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 eksprymowanych 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 zajęcia procesu metylacji adenozyne 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. Wykazano w pracy spadki 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 funkcjonowaniu tej modyfikacji jest lokalizacja komórkowa poszczególnych mRNA.

11.11.2024 *Kubiak D.*