

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych



Karolina Monika Majewska

Nr albumu: 503244

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Dynamika składu molekularnego ciał Cajala jako centrów
regulacyjnych retencji mRNA*

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Biologii Komórkowej i Molekularnej

Promotor pracy: dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Kolowerzo-Lubnau

Toruń, 2025

Podziękowania

Chciałbym wyrazić głęboką wdzięczność wszystkim, którzy wspierali mnie podczas powstawania tej pracy. Szczególnie dziękuję moim Bliskim oraz Przyjaciółom za ich cierpliwość i motywację w trudnych chwilach. Jestem także wdzięczna moim Koleżankom i Kolegom z Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych za życzliwość i inspirujące rozmowy.

Serdeczne podziękowania kieruję do:

Pana dr. hab. Dariusza J. Smolińskiego, prof. UMK – za otwartość na moje naukowe poszukiwania, cenne uwagi kształtujące kierunek badań, oraz za to, że zawsze mogłam liczyć na eksperckie spojrzenie w momentach wątplenia. Dziękuję za czas poświęcony na dyskusje, które poszerzały moje horyzonty. Wreszcie – za budowanie przestrzeni, w której ciekawość naukowa mogła swobodnie przerodzić się w pasję.

Pani dr Agnieszki Kołowerzo-Lubnau – za inspirację do podjęcia badań stanowiących fundament tej pracy, cierpliwe wsparcie w rozwiązywaniu napotkanych trudności oraz pomoc w przezwyciężaniu wyzwań. Dziękuję za stałą motywację, życzliwość i merytoryczne wskazówki, które towarzyszyły mi na każdym etapie realizacji projektu.

Pana mgr. Michała Świdzińskiego - za nieocenioną pomoc techniczną, skrupulatność, cierpliwość i zawsze życzliwe podejście, które dodawało mi otuchy w trakcie pracy. Fachowa wiedza oraz gotowość do pomocy na każdym etapie były dla mnie ogromnym wsparciem i znacząco ułatwiły realizację eksperymentów. Jestem bardzo wdzięczna za taką serdeczność i profesjonalizm

Dodatkowo pragnę podziękować pracownikom Katedry Biologii Komórkowej i Molekularnej za serdeczność i przyjazną atmosferę, która towarzyszyła mojej pracy.

FINANSOWANIE

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

1. **Narodowego Centrum Nauki** (grant Preludium 21 2022/45/N/NZ3/02015, przyznany dla autora rozprawy; grant Sonata 11 2016/21/D/NZ3/00369, wykonawstwo autora rozprawy).
2. **Uniwersytetu Mikołaja Kopernika** (Program „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza” – finansowanie w ramach konkursu Grants4NCUstudents (konkurs skierowany do: studentów UMK, Studenckich Kół Naukowych UMK i doktorantów UMK, finansowanie przyznane dla autora rozprawy w roku 2022)
3. **Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST** (dofinansowanie kosztów uczestnictwa w warsztatach poszerzających wiedzę oraz umiejętności z zakresu analiz bioinformatycznych – umożliwiło to poprawną analizę oraz interpretację wyników zamieszczonych w niniejszej pracy oraz dofinansowanie kosztów związanych z zakupem odczynników niezbędnych do realizacji zaplanowanych prac eksperymentalnych, finansowanie przyznane dla autora rozprawy w latach 2021, 2022, 2023 oraz 2025).

PUBLIKACJE

W trakcie realizacji studiów doktoranckich opublikowano następujące prace:

1. **Majewska K**, Wroblewska-Ankiewicz P, Rudzka M, Golebiewski M, Smolinski DJ, Kołowerzo-Lubnau A. 2021. Different patterns of mRNA nuclear retention during meiotic prophase in larch microsporocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 22(16), 8501.

DOI: 10.3390/ijms22168501.

Current Impact Factor: 5.924, 5-year Impact Factor: 6.132

2. Rudzka M, Hyjek-Składanowska M, Wróblewska-Ankiewicz P, **Majewska K**, Gołębiewski M, Sikora M, Smoliński DJ, Kołowerzo-Lubnau A. 2022. Functional nuclear retention of pre-mRNA involving Cajal bodies during meiotic prophase in European larch (*Larix decidua*). *The Plant Cell* 34(6), 2404-2423.

DOI: 10.1093/plcell/koac091

Current Impact Factor: 11.6, 5-year Impact Factor: 12.1

Spis treści

STRESZCZENIE

1.WSTĘP	13
1.1 Jądro komórkowe.....	13
1.2 Biomolekularne kondensaty.....	14
1.2.1 Separacja faz ciecz-ciecz (LLPS).....	15
1.2.2 Ciała Cajala – odkrycie oraz podstawowe komponenty tych kondensatów.....	20
1.2.3 Funkcje ciał Cajala.....	25
1.2.3.1 Udział ciał Cajala w biogenezie i składniu U snRNP.....	26
1.2.3.2 Przypuszczalna rola CB w biogenezie oraz akumulacji małych RNA.....	30
1.2.3.3 Rola w biogenezie siRNA oraz miRNA.....	32
1.2.3.4 Udział ciał Cajala w utrzymaniu długości telomerów.....	35
1.2.3.5 Udział CB w odpowiedzi na stres abiotyczny oraz biotyczny.....	36
1.3 Regulacja ekspresji genów kodujących białka w komórkach eukariotycznych.....	38
1.3.1 Włączanie lub wyłączanie ekspresji genu – czyli regulacja zachodzenia procesu transkrypcji.....	39
1.3.2 Ko-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów.....	41
1.3.3 Proces splicingu oraz dostępność czynników splicingowych jako kolejny etap regulacji ekspresji genów.....	42
1.3.4 Alternatywny splicing (AS) jako narzędzie służące regulacji syntezy alternatywnych izoform mRNA.....	44
1.3.5 Regulacja poziomu ekspresji genu na etapie post-transkrypcyjnym.....	47
1.3.6 Udział ciał Cajala w regulacji ekspresji genów poprzez jądrową retencję transkryptów w komórkach roślinnych.....	47
2. CEL PRACY	51
3. MATERIAŁY	53
3.1 Materiał badawczy	53
3.2 Oligonukleotydy	54
3.3 Przeciwciała	56
3.4 Odczynniki	58
3.5 Roztwory, bufor i mieszaniny	60
4. METODY	63
4.1 Analizy mikroskopowe.....	63
4.1.1 Przygotowanie materiału do obserwacji mikroskopowych.....	63
4.1.2 Badanie synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów oraz czasu trwania pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	64
4.1.3 Lokalizacja RNA i białek.....	66

4.1.4 Mikroskopia.....	72
4.2 Badanie specyficzności wiązania antygenu przez przeciwciała anty-koilina.....	73
4.2.1 Izolacja białek do analizy metodą Western blot.....	74
4.2.2 Pomiar stężenia białek w próbce.....	74
4.2.3 Elektroforeza białek SDS-PAGE.....	74
4.2.4 Transfer białek z żelu na membranę PVDF.....	75
4.2.5 Western blot.....	76
4.3 Analizy kwasów nukleinowych.....	78
4.3.1 Izolacja RNA z mikrosporocytów <i>Larix decidua</i> Mill.....	78
4.3.2 Izolacja total RNA do analizy transkryptomów poszczególnych faz syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	79
4.3.3 Izolacja mRNA z total RNA do analizy transkryptomów poszczególnych faz syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	80
4.3.4 Odwrotna transkrypcja.....	81
4.3.5 PCR w czasie rzeczywistym (<i>ang. quantitative PCR</i> , qPCR).....	81
4.3.6 Analiza ilościowa i jakościowa kwasów nukleinowych.....	82
4.3.7 Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania.....	82
4.3.8 Sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna.....	83
5. WYNIKI	85
5.1 Czas trwania poszczególnych stadiów cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	85
5.2 Dwa główne wzorce syntezy i eksportu mRNA.....	88
5.3 Ciała Cajala jako miejsce akumulacji niedojrzałych form transkryptów.....	94
5.3.1 Szczegółowa analiza transkryptów kodujących białka podjednostki RPB10 polimerazy RNA II.....	94
5.3.2 Pre-mRNA kodujące różne białka Sm ulegają retencji w tym samym czasie i akumulują się w tych samych miejscach.....	97
5.4 Analiza transkryptomu mikrosporocytów modrzewia.....	103
5.4.1 Walidacja wyników analizy transkryptomu na podstawie wybranych transkryptów.....	105
5.4.2 Wyniki hybrydyzacji <i>in situ</i> z wykorzystaniem sond komplementarnych do sekwencji powstałych po splicingu intronów retencyjnych.....	115
5.5 Zmiany w składzie molekularnym ciał Cajala podczas trwania cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	120
5.5.1 Zmiany w składzie poszczególnych elementów tworzących U snRNP w CB podczas trwania cyklu syntezy i eksportu mRNA.....	121
5.5.1.1 Synteza U snRNA.....	121
5.5.1.2 Dystrybucja białek Sm.....	124

5.5.1.3 Dojrzewanie końca 5' U snRNA.....	126
5.5.2 Koilina – element strukturalny CB istotny dla ich prawidłowego funkcjonowania w tym rekrutacji U snRNP.....	130
5.6 Organizacja przestrzenna ciał Cajala – strefowość występowania białek oraz RNA na terenie tych kondensatów.....	133
6. DYSKUSJA	137
6.1 W dyfuzyjnym stadium diplotenu: pulsacyjna aktywność transkrypcyjna oraz retencja nowosyntetyzowanych mRNA.....	137
6.2 Zróżnicowana dynamika eksportu mRNA.....	141
6.3 Ciała Cajala jako miejsca akumulacji niedojrzałych form mRNA oraz funkcjonalność transkryptów retencyjnych.....	144
6.4 Dynamika składu ciał Cajala zależna od pełnionej funkcji w cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	152
7. PODSUMOWANIE.....	164
WYKAZ RYCIN I TABEL	166
LITERATURA.....	169
SUPLEMENTY	182

STRESZCZENIE

Problem badawczy: Ekspresja genów w komórkach eukariotycznych jest wynikiem złożonej sieci procesów, które wykraczają daleko poza samą inicjację transkrypcji. Chociaż transkrypcja stanowi punkt wyjścia, to ostateczny poziom i moment syntezy białka zależą od wielu mechanizmów działających również na poziomie post-transkrypcyjnym. Dzięki nim komórka może elastycznie zarządzać pulą transkryptów, tworząc mechanizmy buforujące, które pozwalają reagować na zmienne warunki i dynamiczne potrzeby fizjologiczne. Można do nich zaliczyć: regulację eksportu RNA, translacji mRNA, degradację pre-mRNA i mRNA czy kontrolę aktywności samego białka. Jednym z takich mechanizmów jest również jądrowa retencja poli(A)RNA, która pełni funkcję regulacyjną, opóźniając moment wykorzystania gotowych transkryptów.

Badania prowadzone na mikrosporocytach modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) wskazują, że retencja mRNA ma charakter globalny i jest ściśle powiązana z obecnością ciał Cajala (*ang.* *Cajal bodies*, CB). Jest to pierwsza przesłanka sugerująca udział tych struktur jądrowych w kontroli losów transkryptów u roślin. Jak wykazały wstępne analizy, wiele z gromadzonych w CB mRNA posiada zachowane sekwencje intronowe, co wskazuje, że retencja intronów może stanowić kluczowy element tego mechanizmu regulacyjnego. Szczególnie istotne wydaje się to w komórkach, w których transkrypcja przebiega w sposób pulsacyjny – zatrzymywanie transkryptów w jądrze umożliwia przesunięcie w czasie ich translacji i dostosowanie syntezy białek do aktualnych potrzeb metabolicznych, nawet wtedy, gdy aktywność transkrypcyjna chwilowo słabnie. Dokładny mechanizm jądrowej retencji z udziałem ciał Cajala pozostaje niepoznany, jednak jego wyjaśnienie stanowi istotne wyzwanie badawcze. Pogłębienie wiedzy w tym zakresie może rzucić nowe światło na rolę tych struktur w regulacji ekspresji genów u roślin, a także dostarczyć kluczowych informacji dla zrozumienia procesów warunkujących prawidłowy przebieg podziałów mejotycznych i rozwój gametofitu.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie transkryptów wykazujących retencję intronów oraz zbadanie składu molekularnego ciał Cajala na poszczególnych etapach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Uzyskane wyniki stanowią pierwszy opis udziału tych domen w jądrowej retencji RNA u roślin. Zaobserwowana akumulacja w obrębie CB transkryptów zawierających retencyjne introny wskazuje na związek pomiędzy obecnością takich intronów a lokalizacją pre-mRNA w ciałach Cajala. Podkreśla to znaczącą rolę CB w post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, co może mieć kluczowe znaczenie dla prawidłowego przebiegu podziału komórkowego i powstania dojrzałej, funkcjonalnej mikrospory.

Wyniki: Wykazano, że w mikrosporocytach modrzewia, charakteryzujących się pulsacyjną aktywnością transkrypcyjną, poszczególne mRNA różnią się dynamiką eksportu. Zróżnicowanie to może pełnić rolę precyzyjnego mechanizmu kontroli czasu syntezy kodowanych białek, umożliwiając efektywne zarządzanie pulą transkryptów w odpowiedzi na zmiany w ekspresji genów. Analizy bioinformatyczne, potwierdzone obserwacjami mikroskopowymi, wykazały, że większość transkryptów akumulowanych w CB zawiera retencyjne introny, które są ostatecznie usuwane w procesie splicingu. Wśród tych transkryptów znajdują się również mRNA kodujące białka maszynery transkrypcyjnej i splicingowej, których retencja może modulować dojrzewanie innych transkryptów i sprzyjać ich czasowej akumulacji w jądrze. Z kolei analiza zmian składu molekularnego ciał Cajala w trakcie cyklu wykazała, że ich funkcja ewoluuje w czasie. Na początku cyklu CB gromadzą dojrzałe kompleksy U snRNP, które w pierwszej kolejności są wykorzystywane w procesie ko-transkrypcyjnego splicingu. Natomiast pod koniec cyklu stają się przede wszystkim miejscem akumulacji snRNA przygotowywanych do eksportu z jądra do cytoplazmy. Zgromadzone w ten sposób snRNA stanowią rezerwuar, który zostaje wykorzystany na początku kolejnego cyklu, podczas następnego pulsu aktywności transkrypcyjnej.

ABSTRACT

Research problem: Gene expression in eukaryotic cells results from a complex network of processes that extend far beyond transcription initiation. Although transcription constitutes the starting point, the ultimate level and timing of protein synthesis are determined by multiple mechanisms acting also at the post-transcriptional level. These mechanisms allow the cell to flexibly manage its transcript pool, establishing buffering systems that enable adaptation to fluctuating conditions and dynamic physiological needs. They include, among others, the regulation of RNA export, mRNA translation, pre-mRNA and mRNA degradation, as well as control of protein activity itself. One such regulatory mechanism is nuclear retention of poly(A)RNA, which delays the utilization of mature transcripts and thereby fine-tunes gene expression.

Studies on microsporocytes of European larch (*Larix decidua* Mill.) indicate that mRNA retention is a global phenomenon tightly associated with the presence of Cajal bodies (CBs). This represents the first evidence suggesting the involvement of these nuclear domains in transcript fate control in plants. Preliminary analyses revealed that many of the mRNAs accumulated within CBs retain intronic sequences, suggesting intron retention as a key component of this regulatory mechanism. This is particularly relevant in cells exhibiting pulsatile transcriptional activity, where nuclear retention of transcripts allows their translation to be shifted in time and synchronized with the metabolic needs of the cell, even during periods of reduced transcriptional output. Although the exact mechanism of nuclear retention involving Cajal bodies remains unclear, elucidating this process constitutes an important research challenge. Advancing knowledge in this area may shed new light on the role of these nuclear structures in plant gene expression regulation and provide essential insights into the mechanisms underpinning meiotic progression and gametophyte development.

Aim of the study: The aim of this work was to identify transcripts characterized by intron retention and to investigate the molecular composition of Cajal bodies at successive stages of the poly(A)RNA synthesis and export cycle. The results presented here constitute the first description of CBs involvement in nuclear RNA retention in plants. The observed accumulation of intron-retaining transcripts within CBs points

to a strong link between the presence of introns and the localization of pre-mRNAs in these nuclear bodies. This highlights the significant role of CBs in post-transcriptional gene regulation, which may be crucial for proper cell division and the formation of a mature, functional microspore.

Results: It was demonstrated that in microsporocytes of European larch, characterized by pulsatile transcriptional activity, individual mRNAs exhibit distinct dynamics of nuclear export. Such heterogeneity may serve as a precise regulatory mechanism controlling the timing of protein synthesis, thereby enabling efficient management of the transcript pool in response to changes in gene expression. Bioinformatic analyses, supported by microscopic observations, showed that most transcripts accumulated in CBs contain retained introns, which are ultimately removed through splicing. Among these transcripts are mRNAs encoding components of the transcriptional and splicing machineries, whose retention may modulate the maturation of other mRNAs and contribute to their transient nuclear accumulation. Furthermore, the analysis of changes in the molecular composition of Cajal bodies during the cycle revealed that their function evolves over time. At the beginning of the cycle, CBs accumulate mature U snRNP complexes, which are primarily employed in co-transcriptional splicing. By contrast, at the end of the cycle they serve mainly as sites of snRNA accumulation, preparing these molecules for export from the nucleus to the cytoplasm. The snRNA stored in this manner constitutes a reservoir that is subsequently utilized at the onset of the next cycle, during the following pulse of transcriptional activity.

1. WSTĘP

Podstawową różnicą pomiędzy komórkami eukariotycznymi a prokariotycznymi jest obecność jądra komórkowego. Termin „prokaryote” (dosłownie „przed jądrem”) odnosi się do komórek, które nie posiadają tego organellum. W komórkach prokariotycznych materiał genetyczny znajduje się w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą, ponieważ brakuje w nich struktur błonowych tworzących wewnątrzkomórkowe kompartmenty. Komórki eukariotyczne, które ewolucyjnie pojawiły się później, charakteryzują się obecnością błonowych organelli, takich jak jądro komórkowe, mitochondria czy chloroplasty. Dzięki obecności podwójnej błony otaczającej jądro, materiał genetyczny jest fizycznie oddzielony od cytoplazmy, co umożliwia zaawansowaną organizację procesów biochemicznych w komórce. Taka kompartmentalizacja pozwala na jednoczesne zachodzenie tysięcy procesów niezbędnych dla jej prawidłowego funkcjonowania. Powstanie komórek eukariotycznych miało kluczowe znaczenie dla ewolucji życia wielokomórkowego i różnorodności biologicznej na Ziemi (Fuerst 2010).

1.1 Jądro komórkowe

Jądro komórkowe było pierwszym zaobserwowanym organellum komórkowym. W 1828 roku zostało ono nazwane przez szkockiego botanika Roberta Browna (Brown 1828). Początkowo, z powodu ograniczeń ówczesnych mikroskopów świetlnych, uważano, że jego wnętrze jest strukturalnie jednorodne. Jednak rozwój mikroskopii zmienił to przekonanie. Obecnie wiadomo, że w jądrach interfazowych chromosomy zajmują określone, nieprzypadkowe regiony zwane terytoriami chromosomowymi (Cremer i Cremer 2010).

Badania nad organizacją jądra wykazały, że jest ono wysoce zorganizowanym i dynamicznym przedziałem komórkowym. Przeprowadza i reguluje wiele procesów, co tłumaczy obecność specyficznych mikrośrodków w jego strukturze. Te mikrośrodowiska, znane jako biomolekularne kondensaty, odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu i regulacji procesów zachodzących w jądrze.

1.2 Biomolekularne kondensaty

Jądro komórki eukariotycznej jest miejscem zachodzenia tysięcy procesów biochemicznych. Ich niezakłócony przebieg jest istotny dla prawidłowego funkcjonowania komórki, a co za tym idzie całego organizmu. W obrębie tego organellum odbywają się m.in.: replikacja DNA, transkrypcja, dojrzewanie pre-mRNA, synteza rRNA i podjednostek rybosomalnych, a także synteza miRNA, siRNA i scaRNA. Jądro odgrywa również rolę w eksporcie dojrzałych mRNA do cytoplazmy oraz w regulacji wielu innych procesów molekularnych. Jest ono centrum regulacyjnym, które odpowiada za kontrolę ekspresji genów, umożliwiając rozwój, wzrost, prawidłową odpowiedź komórki na bodźce środowiskowe oraz adaptację do zmieniających się warunków. To właśnie kompartmentalizacja oraz dynamiczna organizacja jądra sprawiają, że możliwe jest równoczesne i precyzyjne przeprowadzanie tysięcy skomplikowanych procesów biochemicznych, co podkreśla jego kluczową rolę w życiu komórki (Fuerst 2010; Cremer i Cremer 2010).

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że biomolekularne kondensaty odgrywają kluczową rolę w organizacji, kontroli i regulacji wielu z wymienionych wcześniej procesów biochemicznych. Funkcjonują one jako swoiste „fabryki” molekularne, w których gromadzone są składniki, takie jak białka czy kwasy nukleinowe, niezbędne do prawidłowego przebiegu określonych reakcji (Taliński i wsp. 2023). Dzięki lokalnej koncentracji lub izolacji tych określonych czynników biomolekularne kondensaty sprzyjają precyzyjnej, przestrzennej i czasowej regulacji reakcji makromolekularnych oraz zwiększają ich wydajność katalityczną (Söding i wsp. 2020).

W odróżnieniu od kanonicznych organelli, takich jak mitochondria, chloroplasty czy lizosomy, kondensaty są nieobłonionymi organellami (*ang. membraneless organelle*, MLO). Ich liczba oraz rozmiary mogą dynamicznie zmieniać się w odpowiedzi na warunki środowiskowe (Fefilova i wsp. 2022). MLO zaangażowane są w szeroki zakres procesów, w tym w metabolizm RNA, biogenezę rybosomów, naprawę DNA, transdukcję sygnałów, mechanizmy odpowiedzi na stres, a także w regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym i post-transkrypcyjnym (Taliński i wsp. 2023).

W komórkach eukariotycznych biomolekularne kondensaty występują zarówno w jądrze komórkowym: jąderko, ciała Cajala czy paraspeckles, a także w cytoplazmie: P-bodies czy granule stresowe (Banani i wsp. 2017). Większość z nich przybiera sferyczny kształt o średnicy od 0,01 do 10 μm . Cechy przypisywane MLO, takie jak sferyczny wygląd czy zdolność do fuzji, są typowe dla struktur o właściwościach cieczy. Zauważono, że pojedyncze kondensaty mogą łączyć się w większe struktury, a także ulegać deformacji lub rozszczepieniu pod wpływem zmieniających się warunków środowiskowych. Przypuszcza się, że MLO są w istocie kroplami cieczy rozproszonymi w nukleoplazmie lub cytoplazmie, powstającymi w wyniku separacji faz typu ciecz-ciecz (*ang. liquid-liquid phase separation, LLPS*). Niektóre z tych kondensatów mogą jednak wykazywać właściwości substancji stałych typu gel-like (Brangwynne i wsp. 2015). Kondensaty są strukturami dynamicznymi, które stale wymieniają swoje komponenty z otaczającym je środowiskiem, czyli cytoplazmą lub nukleoplazmą. Ich obecność została potwierdzona w komórkach zwierzęcych (Nakagawa i wsp. 2012), roślinnych (Weber i wsp. 2008) oraz bakteryjnych (Jin i wsp. 2021). Niektóre MLO pojawiają się jedynie w specyficznych warunkach, takich jak określone stadium rozwoju komórki lub stres (Banani i wsp. 2017). Dzięki zdolności do dynamicznej agregacji i deagregacji, umożliwiają komórkom adaptację do stale zmieniających się warunków środowiskowych.

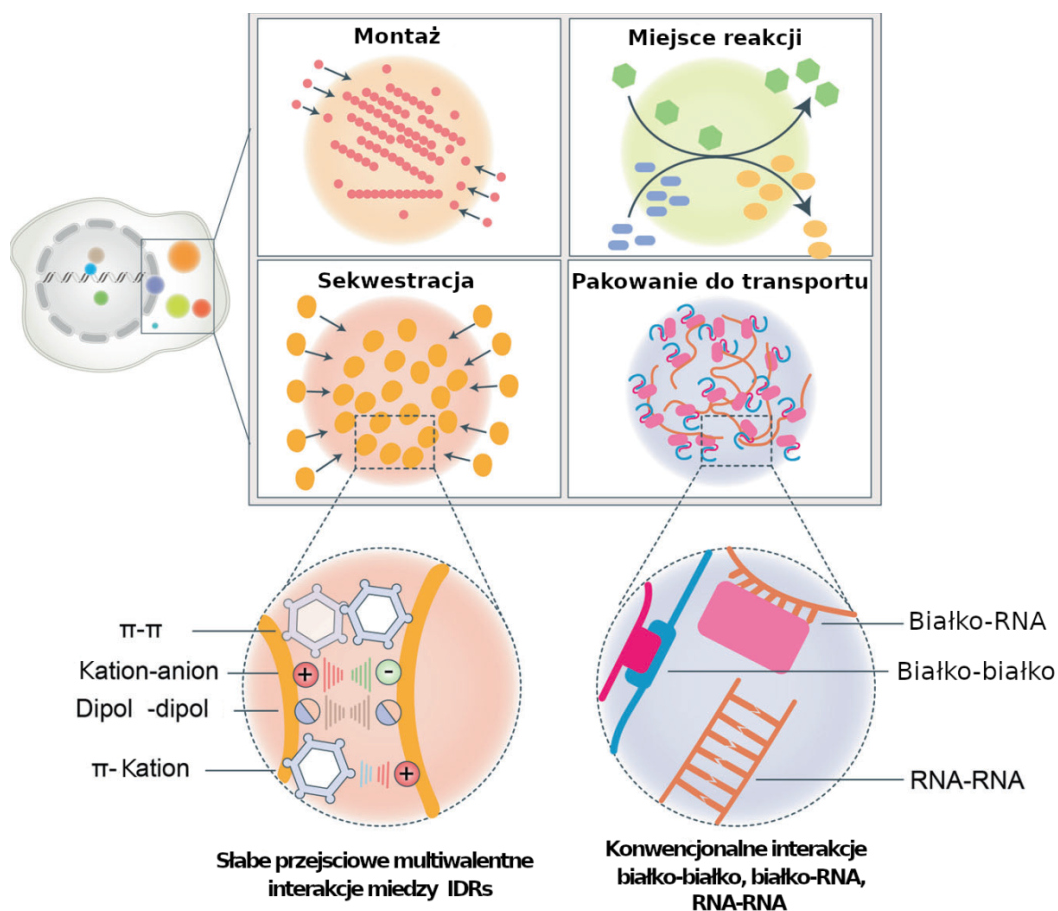
1.2.1 Separacja faz ciecz-ciecz (LLPS)

W 2009 roku Tony Hyman i Cliff Brangwynne odkryli, że P-bodies wykazują zachowanie przypominające ciecz, a ich lokalizacja w komórce wynika z dynamicznych procesów rozpuszczania i kondensacji. To odkrycie zasygnalizowało, że separacja faz typu LLPS może być kluczowym mechanizmem organizacji organelli pozbawionych błon (Brangwynne i wsp. 2009). W 2012 roku Michael Rosen i jego zespół odkryli, że gdy białka multiwalentne oddziałują ze sobą to wraz ze wzrostem ich stężenia obserwuje się ich szybką przemianę od małych kompleksów do dużych struktur polimerycznych, a fenomen ten towarzyszy makroskopowemu zjawisku LLPS (Li i wsp. 2012). Najnowsze badania sugerują, że LLPS odgrywa istotną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak tworzenie granul stresowych (Molliex i wsp. 2015;

Riback i wsp. 2017), organizacja heterochromatyny (Strom i wsp. 2017; Larson i wsp. 2017), regulacja transkrypcji, składanie kompleksu miRISC (Sheu-Gruttadauria i wsp. 2018) czy autofagia (Zhang i wsp. 2018; Sun i wsp. 2018).

Dotychczasowe badania sugerują, że istnieją dwa rodzaje oddziaływań multiwalentnych przyczyniających się do LLPS (Ryc.1), tj. wewnątrzkomórkowe oddziaływania białko-białko, białko-RNA i RNA-RNA oraz słabe, przejściowe, multiwalentne oddziaływania między obszarami wewnątrznie nieuporządkowanymi białek tzw. IDRs (*ang. intrinsically disordered regions*) o niskiej złożoności sekwencji aminokwasowej. W tym oddziaływania π - π , kation-anion, dipol-dipol i π -kation (Li i wsp. 2012; Wang i wsp. 2021).

LLPS można zatem opisać jako proces wynikający z sił generowanych przez gradienty elektrochemiczne wewnątrz komórek. Gradienty te są determinowane przez multiwalentne interakcje, które kształtują przestrzenne rozmieszczenie cząsteczek w „kroplach” takich jak biomolekularne kondensaty (MLO). Jednocześnie to rozmieszczenie przestrzenne wpływa na możliwość zachodzenia określonych interakcji biochemicznych (Wang i wsp. 2021).



Ryc. 1 Schemat przedstawiający role kondensatów oraz siły jakie napędzają zjawisko LLPS (Wang i wsp. 2021 - zmodyfikowano).

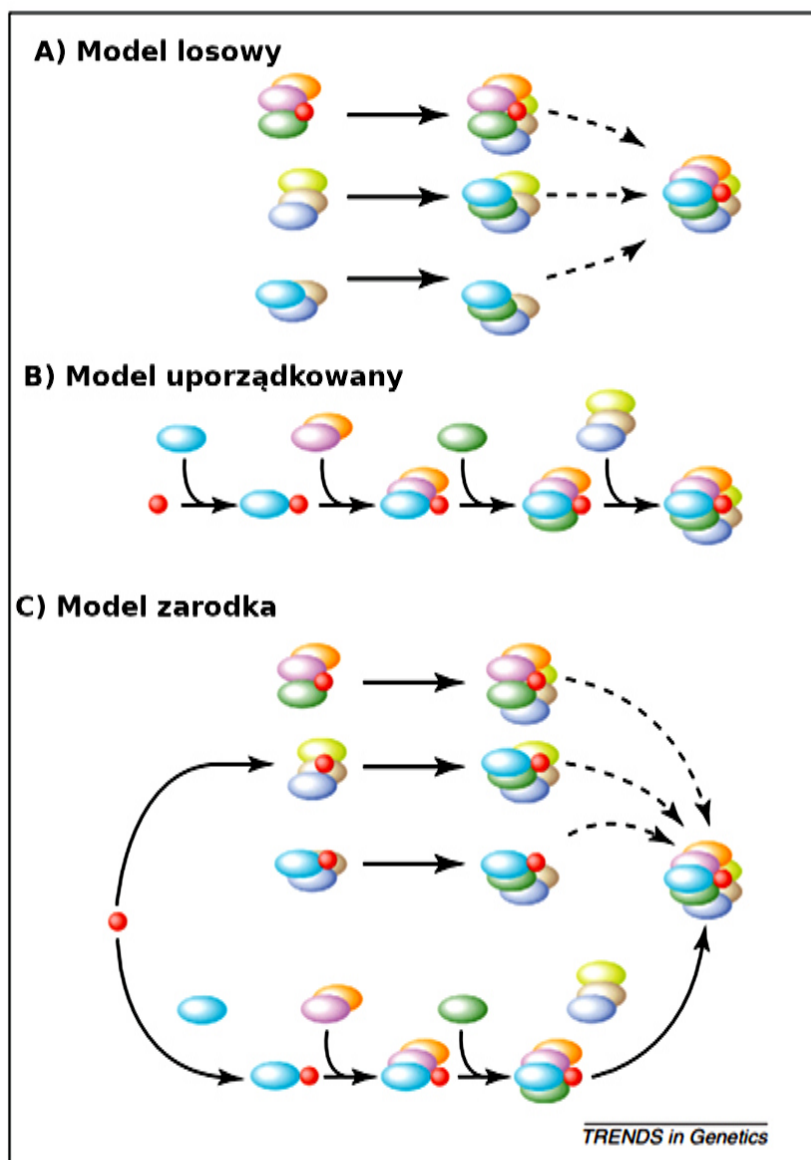
MLO mogą funkcjonować jako: miejsca składania dużych kompleksów, miejsca promujące zachodzenie reakcji biochemicznych, mogą również służyć sekwestracji (odizolowaniu) określonych białek w celu zahamowania lub promowania reakcji biochemicznych. Niektóre z nich stanowią również miejsce przygotowywania kompleksów rybonukleoproteinowych do transportu. Różnorodność pełnionych przez nie funkcji wynika z ich zróżnicowanego składu molekularnego, który wpływa na sposób ich samoorganizacji (Wang i wsp. 2021). W literaturze wyróżnia się trzy główne modele mogące wyjaśniać proces samoasocjacji biomolekularnych kondensatów: 1) model losowy, 2) model uporządkowany oraz 3) model zarodka (Mao i wsp. 2011). Każdy z tych modeli opisuje różne mechanizmy organizacji molekuł w fazie skondensowanej, zależne od warunków wewnątrzkomórkowych i specyficznych właściwości białek oraz innych składników.

Przypuszczalne modele samoasocjacji biomolekularnych kondensatów

Model losowy zakłada, że proces samoasocjacji kondensatów wynika z przypadkowych interakcji między składnikami, które je tworzą. Składanie kondensatu jest w dużej mierze chaotyczne i pozbawione wyraźnego, hierarchicznego porządku (Ryc.2A). W ramach tego modelu przyjmuje się, że wszystkie składniki kondensatu są traktowane równorzędnie pod względem kolejności montażu. Istnieje zatem wiele możliwych ścieżek, które mogą prowadzić do utworzenia MLO (Mao i wsp. 2011).

Model uporządkowany, w przeciwieństwie do modelu losowego, zakłada, że montaż składników odbywa się w ściśle kontrolowanym i sekwencyjnym porządku (Ryc.2B). W tym przypadku poszczególne komponenty różnią się hierarchicznie, co oznacza, że do utworzenia kondensatu może prowadzić tylko jedna lub ograniczona liczba ścieżek (Mao i wsp. 2011).

Model zarodka opiera się na dwóch wcześniej przedstawionych modelach, z tą różnicą, że do zainicjowania tworzenia kondensatu wymagana jest obecność "zarodka", czyli pojedynczego składnika lub kompleksu składników (Ryc.2C). Zarodek w tym przypadku stanowi centrum, które inicjuje proces agregacji poprzez losowe lub hierarchiczne przyłączanie kolejnych składników budujących dany kondensat. Elementami inicjującymi proces zarodkowania MLO mogą być zarówno białka, jak i specyficzne RNA, które akumulują się w danym obszarze (Mao i wsp. 2011).



Ryc. 2 Schemat przedstawiający hipotetyczne modele samoasocjacji molekularnych biokondensatów (Mao i wsp. 2011 - zmodyfikowano).

Przedstawione hipotetyczne modele w sposób ogólny opisują zasady formowania się biomolekularnych kondensatów. Szczegółowy przebieg procesu samoasocjacji MLO jest jednak indywidualny i specyficzny dla każdego typu kondensatów. W niniejszej pracy omówione zostaną wyniki badań dotyczące specyficznego rodzaju biomolekularnych kondensatów, jakimi są ciała Cajala (*ang. Cajal bodies, CB*). W związku z tym, w dalszej części pracy przedstawiona zostanie aktualna wiedza na temat formowania się oraz roli tych MLO w komórkach eukariotycznych.

1.2.2 Ciała Cajala – odkrycie oraz podstawowe komponenty tych kondensatów

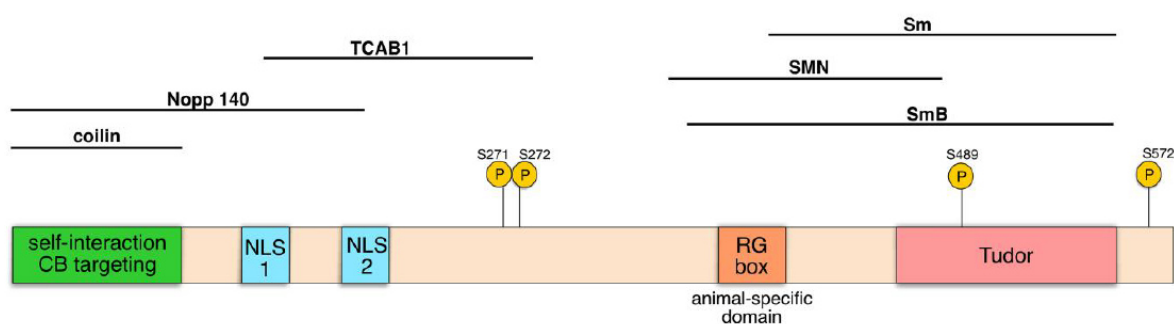
Odkrycia ciał Cajala dokonał około 120 lat temu hiszpański neurobiolog Santiago Ramón y Cajal, który po raz pierwszy zaobserwował je w komórkach nerwowych kręgowców (Cajal 1903). Warto zaznaczyć, że w 1906 roku, dzięki temu odkryciu, Cajal otrzymał Nagrodę Nobla za swoje osiągnięcia w dziedzinie neurobiologii. Do tej pory obecność tego rodzaju biomolekularnych kondensatów potwierdzono w komórkach ssaków, płazów, owadów, drożdży oraz roślin (Cioce i Lamond 2005). Ciała Cajala to dynamiczne, sferyczne kondensaty subjądrowe o średnicy wynoszącej od 0,1 do 6 μm (Nunes i Moretti 2017; Smoliński i Kołowerzo 2012). Liczba oraz rozmiary CB w komórkach mogą różnić się w zależności od organizmu, typu tkanki oraz etapów różnicowania czy rozwoju komórki. Zwykle obserwuje się ich zwiększoną liczbę we wczesnych embrionach, a następnie ich zmniejszenie w miarę różnicowania się komórek (Staněk i Neugebauer 2006).

Główne zainteresowanie badaniami tych jądrowych substruktur wzrosło dopiero w latach 90. XX wieku, kiedy to w pierwszej kolejności w komórkach ludzkich, a następnie u innych kręgowców, zidentyfikowano białko - koilinę (Machyna i wsp. 2015). Białko to pełni rolę rusztowania i jest obecnie uważane za marker ciał Cajala. Dzięki badaniom przeprowadzonym na mutantach odkryto, że koilina jest białkiem istotnym nie tylko dla formowania się, ale i utrzymania prawidłowej struktury ciał Cajala (Staněk i Neugebauer 2006).

Sekwencja aminokwasowa koiliny nie jest silnie konserwowana ewolucyjnie i identyfikacja genów koiliny u roślin, czy u owadów tj. *Drosophila melanogaster* stanowiła duże wyzwanie, choć w tych organizmach potwierdzono obecność CB (Machyna i wsp. 2015). Najwyższą zgodność ewolucyjną na poziomie sekwencji aminokwasowej wykazano w obrębie końca N i C koiliny (Taliński i wsp. 2023). Środkowa część nie jest konserwowana, a u kręgowców może zawierać unikatowe domeny tj. RG-box (Ryc.3).

Dodatkowo, wykazano, że w N-końcowej części tego białka znajduje się domena odpowiedzialna za jego samoasocjację. Poza koiliną, istotny wpływ na formowanie ciał Cajala mają także procesy związane z syntezą, przetwarzaniem, rekrutacją oraz dojrzewaniem różnych rodzajów RNA, zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych (Taliany i wsp. 2023).

Struktura drugorzędowa koiliny w *Arabidopsis thaliana* składa się z trzech głównych domen: globularnej domeny N-końcowej, silnie nieuporządkowanej domeny centralnej oraz domeny C-końcowej, która zawiera motyw podobny do Tudor-like (Ryc.3). Motyw Tudor w koilinie *A.thaliana* jest podobny do domeny Tudor w koilinie ludzkiej, zaangażowanej w wiązanie kwasów nukleinowych i zmodyfikowanych aminokwasów, co może być istotne dla potencjalnej kondensacji CB. U zwierząt domena C-końcowa odpowiedzialna jest za interakcje z SMN (*ang. survival motor neuron protein*) oraz U snRNP (Hebert i Matera 2000; Hebert i wsp. 2001). U ludzi wykazano, że domena N-końcowa (1-92 aminokwasy) może oddziaływać samoistnie, odgrywając rolę w homodimeryzacji i kierowaniu koiliny do ciał Cajala oraz w *de novo* formowaniu się tych struktur. Obszar centralny zawiera dwa sygnały lokalizacji jądrowej oraz domniemaną sekwencję lokalizacji jąderkowej.



Ryc. 3 Schemat przedstawiający funkcjonalne domeny koiliny oraz partnerów z którymi oddziałuje (dla koiliny zwierzęcej oraz roślinnej). Kluczowe cechy strukturalne: uporządkowana domena samo-interakcji i ukierunkowania do ciał Cajala (zielony), dwuczłonowy sygnał lokalizacji jądrowej (niebieski), RG-box (pomarańczowy), domena Tudor-like (różowy). Czarne linie oznaczają fragmenty koiliny, które biorą udział w interakcji z białkiem/RNA podpisanym powyżej linii. Żółtymi kołami oznaczono miejsca fosforylacji seryn w koilinie (Taliany i wsp. 2023).

Wpływ koiliny i jej molekularnych partnerów na formowanie ciał Cajala

Dotychczasowe badania jednoznacznie wykazują, że koilina jest białkiem istotnym do tworzenia w pełni funkcjonalnych ciał Cajala (CB). Po jej usunięciu obserwuje się, że niektóre składniki ciał Cajala tworzą alternatywne struktury, zwane „ciałkami resztkowymi”, które jednak nie zawierają U snRNP, co wskazuje na kluczową rolę koiliny w zbliżaniu wszystkich składników kondensatu (Staněk 2023).

Wkrótce po odkryciu koiliny pojawiło się przypuszczenie, że modyfikacje potranslacyjne mają kluczowy wpływ na zdolność koiliny do formowania ciał Cajala. W pierwszej kolejności zidentyfikowano fosforylację koiliny, obejmującą kilka treonin (m.in. T122 i T303) oraz seryn (szczególnie S271, S489 i S566). Badania na fosfo-mutantach koiliny potwierdziły związek między konkretnymi miejscami fosforylacji a integralnością ciał Cajala (Broome i wsp. 2013). W tym samym czasie wykazano, że wiele kinaz białkowych oraz fosfataz ma wpływ na integralność i liczbę ciał Cajala (Berchtold i wsp. 2018; Jonik-Nowak i wsp. 2018).

Choć fosforylacja koiliny jest wyraźnie kluczowym czynnikiem dla formowania ciał Cajala, to szczegóły molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za to zjawisko są wciąż słabo poznane. Dotychczas nie wykryto modyfikacji w N-końcowej domenie samoasocjacji, co sugeruje, że fosforylacja nie reguluje bezpośrednio oligomeryzacji koiliny. Co więcej, udowodniono, że fosforylacja niektórych aminokwasów ogranicza jej zdolność do wiązania RNA, co wskazuje, że interakcja koiliny z RNA jest istotnym czynnikiem w utrzymaniu integralności CB (Broome i wsp. 2013). Istnieje wiele dowodów na bezpośrednie wiązanie koiliny z RNA, jednak motyw odpowiedzialny za to wiązanie nie został jednoznacznie zidentyfikowany (Makarov i wsp. 2013). Brak tej wiedzy utrudnia bezpośrednie powiązanie poszczególnych miejsc fosforylacji z wiązaniem RNA. Model LLPS przewiduje, że RNA stanowi podstawowy składnik organelli pozbawionych błon. Ciała Cajala zawierają liczne RNA niekodujące, jednak znaczenie RNA w montażu CB nie zostało jeszcze bezpośrednio zbadane (Staněk 2023).

Skupiając się na C-końcu koiliny, warto jednak podkreślić znaczenie fosforylacji S489, która znajduje się w ewolucyjnie zachowanej pętli. Badania wykazały, że mutacja w obrębie S489 wpływa na interakcję koiliny z kilkoma RNA niekodującymi, obecnymi w ciałach Cajala (Broome i wsp. 2013). Jak już wcześniej wspomniano, C-końcowa domena odpowiada za interakcje z U snRNP oraz białkami SMN, które, jak udowodniono, sprzyjają montażowi CB (Xu i wsp. 2005; Shpargel i wsp. 2003). Znaczenie snRNA i U snRNP dla utrzymania integralności ciał Cajala zostało potwierdzone poprzez zahamowanie biogenezy snRNA/U snRNP, co prowadziło do zaburzenia integralności struktury CB (Lemm i wsp. 2006). Z tego względu wydaje się prawdopodobne, że fosforylacja w domenie C-końcowej, a szczególnie w miejscu S489, wpływa na interakcję z U snRNP, które z kolei regulują montaż ciał Cajala.

Analizując powyższe doniesienia dotyczące samoasocjacji ciał Cajala, można zauważyć, że CB nie podlegają prostemu LLPS. Zrozumienie działania koiliny oraz jej roli w formowaniu CB wymaga dalszych badań. Niemniej jednak, ten wieloczynnikowy proces tworzenia CB stanowi klucz do efektywnego reagowania tych kondensatów na zmiany zachodzące w wewnątrzkomórkowym metabolizmie wielu niekodujących RNA, a jednocześnie umożliwia integrację sygnałów płynących z różnych szlaków sygnalizacyjnych.

Poza koiliną równie istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu ciał Cajala odgrywa oddziałujące z nią białko SMN. Białko to lokalizuje się zarówno w cytoplazmie jak i jądrze lecz jego jądrowa lokalizacja dotyczy dwóch typów kondensatów: ciał Cajala oraz tzw. Gems bodies (Matera i Frey 1998), które często są ze sobą połączone lub blisko położone. Jest ono częścią cytoplazmatycznego kompleksu SMN, który ponad to składa się z ośmiu białek: Gemin2-8 oraz Unrip (Pánek i wsp. 2023). Badania, które analizowały znaczenie poszczególnych komponentów kompleksu SMN, ujawniły, że SMN i Gemin2-4 są kluczowe dla montażu pierścienia białek Sm na spliceosomalnych U snRNP (Meister i wsp. 2001; Pánek i wsp. 2023). Białko SMN posiada domenę Tudor, która występuje powszechnie wśród różnych białek wiążących rybonukleoproteiny (Ponting 1997) i w przypadku tego białka odpowiada za bezpośrednią interakcję z białkami

Sm (Selenko i wsp. 2001). C-terminalny region SMN jest wymagany dla oligomeryzacji (Lorson i wsp. 1998), wydajnego wiązania białek Sm (Charroux i wsp. 1999), oraz właściwej translokacji tego białka do jądra (Frugier i wsp. 2000). Czynniki odpowiedzialne za adresowanie białek SMN do ciał Cajala nie zostały do tej pory opisane. Jednakże jak już wspomniano obecnie wiadomo, że białko koilina jest niezbędne do rekrutacji SMN i białek Sm do CB. Badania przeprowadzone przez Tucker i zespół wykazały, że celowe usunięcie 487 aminokwasów C-końca koiliny prowadzi do powstania resztkowych ciał Cajala, które nie zawierają SMN i U snRNP, lecz zawierają epitopy jąderkowe Nopp140 i fibrilarynę (Tucker i wsp. 2001).

Wyniki badań przeprowadzonych przez Lemm i zespół wskazują na istotną rolę trwającej biogenezy U snRNP w zachowaniu integralności ciał Cajala. Badanie to polegało m.in. na ocenie lokalizacji koiliny oraz U snRNP w komórkach pozbawionych enzymu TGS1 (enzym przeprowadzający hipermetylację czapeczki 5' snRNA), SMN lub PHAX (adapter eksportu snRNA z jądra do cytoplazmy). Wykazano, że obniżenie poziomu któregośkolwiek z tych trzech białek za pomocą interferującego RNA zakłóca dojrzewanie U snRNP uniemożliwiając ich powrót do jądra. Co istotne, w przypadku braku enzymu TGS1, białek SMN lub PHAX, koilina ulega rozproszeniu w nukleoplazmie, tworząc liczne małe ogniska. Wynika z tego, że integralność ciał Cajala ściśle zależy od przebiegu biogenezy U snRNP (Lemm i wsp. 2006).

Choć koilina jest uważana za białko markerowe ciał Cajala to do tej pory nadal nie udało się zidentyfikować „stałego” składnika ciał Cajala. Wszystkie białka obecne na terenie CB stale wymieniają się z nukleoplazmą, choć tempo tego procesu jest bardzo zróżnicowane. Zbadano, że koilina oraz SMN pozostają w CB dłużej niż inne białka (Deryusheva i Gall 2004). Z kolei przyglądając się ruchom cząsteczek RNP w jądrze komórkowym można je uznać za przypadkowe (Molenaar i wsp. 2004). Z tego względu zakłada się, że ruch U snRNP w jądrze jest głównie napędzany przez dyfuzję. Natomiast, gdy U snRNP trafią do CB, to wówczas zostają tam zatrzymane poprzez interakcje z białkami obecnymi w CB.

Kompleks SMN, który jest niezbędny dla dojrzewania U snRNP w cytoplazmie, jest również istotny dla importu U snRNP do jądra komórkowego (Narayanan i wsp. 2002, 2004). Białko SMN bezpośrednio oddziałuje z koiliną, co może stanowić sygnał kierujący dla nowo zaimportowanych U snRNP (Hebert i wsp. 2001). Ponadto, koilina wiąże białka Sm (Xu i wsp. 2005) i najprawdopodobniej zatrzymuje U snRNP w CB, ponieważ komórki pozbawione funkcjonalnej koiliny nie gromadzą U snRNP w ciałach jądrowych, mimo że SMN nadal koncentruje się w gems bodies w przypadku braku koiliny. Te obserwacje są zgodne z modelem, w którym SMN „przekazuje” nowo zaimportowane U snRNP do koiliny w ciałach Cajala (Tucker i wsp. 2001).

Co ciekawe U6 snRNP, który nie zawiera białek Sm, również jest obecny w CB komórek ssaków. Zamiast tego, U6 snRNP jest kierowany do CB przez domenę HAT SART3 (Staněk i wsp. 2003). Jedynym znanym partnerem wiążącym się z domeną HAT SART3 jest hPrp3, ale jego rola w kierowaniu snRNP U6 lub U4 nie została jeszcze zbadana (Medenbach i wsp. 2004).

1.2.3 Funkcje ciał Cajala

Ciała Cajala to jedne z najbardziej intensywnie badanych molekularnych kondensatów, które są zaangażowane w wiele zróżnicowanych procesów biochemicznych. Dotychczas opisano ich rolę m.in. w biogenezie oraz składaniu U snRNP, funkcjonalnych podjednostek spliceosomalnych, w tym tri-kompleksu U4/U5*U6 snRNP (Staněk 2017; Staněk i wsp. 2008) dojrzewaniu snoRNA (*ang. small nucleolar RNA*) (Machyna i wsp. 2014), utrzymaniu długości telomerów (Venteicher i Artandi 2009) oraz jądrowej retencji transkryptów (Naro i wsp. 2017; Rudzka i wsp. 2022). Część z poznanych funkcji została potwierdzona jedynie w komórkach roślinnych, co może sugerować, że są one specyficzne dla CB występujących u tych organizmów. Dotyczy to roli CB w składaniu kompleksów siRNP, jak również odpowiedzi roślin na stres biotyczny (szkodniki i patogeny) (Kim i wsp. 2007) oraz abiotyczny (np. ekstremalne temperatury, metale ciężkie, susza, wysokie zasolenie i inne) (Górka i wsp. 2022). Z uwagi na kierunek moich badań, pragnę zwrócić szczególną uwagę na rolę ciał Cajala w biogenezie oraz składaniu U snRNP.

1.2.3.1 Udział ciał Cajala w biogenezie i składniu U snRNP

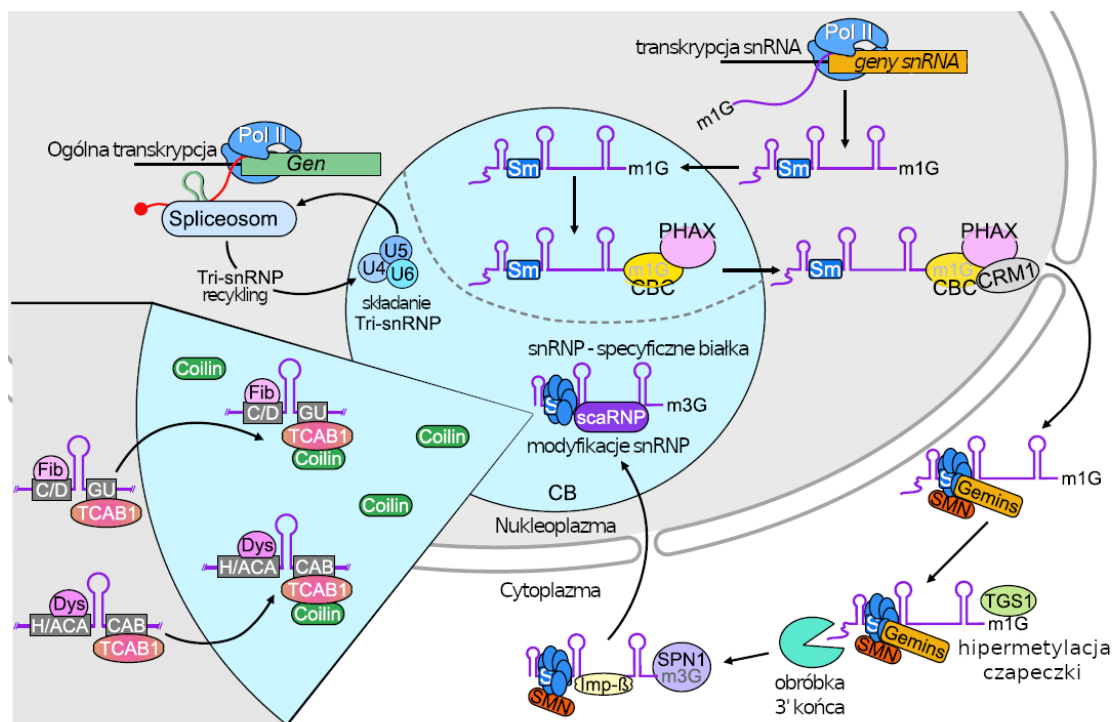
Splicingowe małe jądrowe rybonukleoproteiny (snRNP), to kompleks małych jądrowych RNA bogatych w urydynę (U snRNA) oraz białek. Wyróżnia się pięć klas U snRNA - U1, U2, U4, U5, U6 - z których każda łączy się z unikatowymi dla siebie białkami oraz z pierścieniem białek Sm, który występuje w każdym U snRNP poza U6 snRNP (tu pierścień białek Sm zastąpiony jest pierścieniem zbudowanym z białek LSm - like Sm)(Wahl i wsp. 2009). snRNA są syntetyzowane przez polimerazę RNA II (wyjątkiem jest U6 snRNP, którego syntezę przeprowadza polimeraza RNA III). Ten sam enzym odpowiada za transkrypcję genów kodujących białka, a u roślin także wielu innych niekodujących RNA. Polimeraza RNA II składa się z wielu podjednostek, z których niektóre są specyficzne tylko dla roślin (Hajheidari i wsp. 2013). Jednym z kluczowych elementów funkcjonowania tego enzymu jest domena CTD (*ang. C-terminal domain*), która znajduje się w obrębie podjednostki RPB1 (*ang. RNA polymerase II subunit B1*) polimerazy. U roślin domena ta składa się m.in. z 15 konsensusowych powtórzeń Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7, przy czym część tych reszt ulega fosforylacji w odpowiednich momentach transkrypcji (Hajheidari i wsp. 2013). Zmiana stopnia fosforylacji poszczególnych aminokwasów w obrębie domeny CTD ma kluczowe znaczenie dla etapów procesu transkrypcji (Egloff i Murphy 2008). W przypadku syntezy snRNA fosforylacja w pozycji seryny 7 przez kinazę zależną od cykliny 7 inicjuje transkrypcję, a tym samym ekspresję genów snRNA.

Podobnie jak w przypadku mRNA transkrybowanych przez polimerazę RNA II, kapowanie końca 5' oraz cięcie końca 3' snRNA (U1, U2, U4, U5) odbywa się w sposób kotranaskrypcyjny. Proces terminacji transkrypcji tych cząsteczek wymaga jednak działania dużego kompleksu wielobiałkowego – kompleksu Integrator, który, jak się uważa, uczestniczy w endonukleolitycznym cięciu i poliadenylacji pre-snRNA, działając w połączeniu z sekwencją 3' box, będącą specyficznym sygnałem obróbki snRNA (Chen i Wagner 2010). N7-metyloguanozynowa czapeczka (m⁷G) obecna na końcu 5' nowo syntetyzowanych pre-snRNA jest w pierwszej kolejności rozpoznawana przez kompleks wiążący kap (CBC), po czym dochodzi do przyłączenia ufosforylowanego adaptera eksportowego PHAX. W nukleoplazmie receptor

eksportowy CRM1 (*ang. chromosome region maintenance 1*) oraz GTPaza RAN wiążą się z PHAX, co umożliwia transport cząsteczek pre-snRNA do cytoplazmy przez kompleks poru jądrowego (Ohtani 2018).

Co istotne, wyniki badań sugerują, że pre-snRNA po transkrypcji lokalizują się przejściowo w ciałach Cajala jeszcze zanim zostaną przetransportowane do cytoplazmy; wykazano również, że po wstrzyknięciu pre-snRNA do jądra dochodzi do ich czasowej akumulacji w CB (Suzuki i wsp. 2010). Ponadto, w ciałach Cajala akumulują się także białka PHAX i CRM1, co wspiera hipotezę, że CB odgrywają istotną rolę w formowaniu kompleksu eksportowego pre-snRNA (Ohtani 2018).

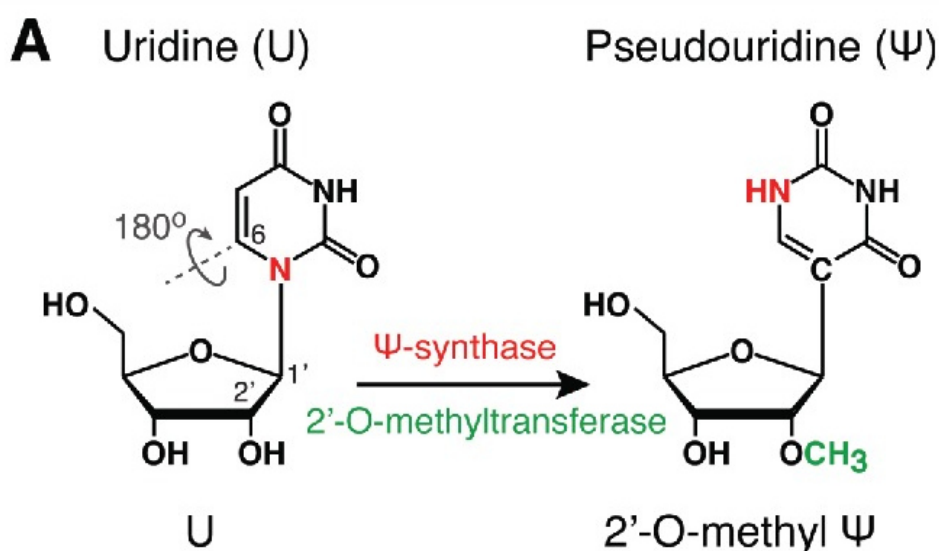
Po dotarciu do cytoplazmy czynniki eksportowe oddysocjują od snRNA, a dołączają białka SMN i Gemin, tworzące kompleks SMN-Gemis, który składa się z białka SMN oraz siedmiu białek Gemin (Gemin 2-8). Kompleks SMN-Gemis pośredniczy w przyłączaniu heptametrycznego pierścienia białek Sm (Sm D1, D2, D3, E, F i G) do miejsca Sm (Sm-site) w obrębie snRNA. Proces ten wspomagany jest przez białka dimetylazy Sm (PRMT5) (Lanfranco i wsp. 2017). Kompleks SMN-Gemis koordynuje również hipermetylację czapeczki 5' snRNA, która jest przeprowadzana przez enzym TGS1, odpowiedzialny za syntezę trimetyloguanozyny. Dodatkowo uczestniczy on w dalszym cytoplazmatycznym przycinaniu końca 3' snRNA (Lanfranco i wsp. 2017).



Ryc. 4 Biogeneza U snRNP. Po transkrypcji pre-snRNA są kierowane do ciał Cajala, gdzie składany jest kompleks eksportowy (CBC, PHAX, CRM1), umożliwiający ich eksport do cytoplazmy. W cytoplazmie czynniki eksportowe oddysocjują, a kompleks SMN-Gemins pośredniczy w składaniu pierścienia Sm, który wiąże się w obrębie miejsca Sm na snRNA. Kompleks SMN-Gemins uczestniczy również w hipermetylacji końca 5' snRNA (tworzenie czapeczki m3G) oraz w przycinaniu końca 3'. Czapeczka m3G jest rozpoznawana przez SPN (snurportin), który rekrutuje importynę-β, inicjując transport zwrotny U snRNP do jądra. W jądrze, bezpośrednio po reimportowaniu, kompleks SMN oddysocjuje od U snRNP. U snRNP akumulują się w ciałach Cajala, gdzie przy udziale scaRNA przeprowadzane są dalsze modyfikacje oraz wiązanie białek specyficznych dla poszczególnych U snRNP. Ciała Cajala są również miejscem de novo składania i ponownego składania tri-snRNPs U4-U6/U5, co umożliwia ich udział w procesie splicingu (Taliński i wsp. 2023, zmodyfikowano).

Hipermetylowana czapeczka 2,2,7-trimetyloguanozyny (m3G) jest rozpoznawana przez snurportynę (SPN), która działa jako adapter importowy, rekrutując receptor importu – importynę-β. Po związaniu z receptorem, U snRNP są transportowane z powrotem do jądra przez kompleksy porów jądrowych. W nukleoplazmie dochodzi do szybkiego oddysocjowania kompleksu SMN od U snRNP, które następnie są kierowane do ciał

Cajala, gdzie przechodzą końcowe etapy dojrzewania (Ohtani 2018). Proces dojrzewania obejmuje metylację i pseudourydylację snRNA, które są katalizowane przez scaRNP – kompleksy małych RNA specyficznych dla ciał Cajala scaRNA (*ang. small Cajal body-specific RNA*) oraz białka enzymatyczne, takie jak metylotransferazy i syntazy pseudourydyny (Bohnsack i Sloan 2018). Pseudourydylacja to proces izomeryzacji urydyny do pseudourydyny, który polega na rozerwaniu wiązania N-glikozydowego, obrocie zasady o 180° i utworzeniu wiązania C-C-glikozydowego (Ryc.5). 2'-O-metylacja polega na metylacji grupy hydroksylowej 2'-rybozy dowolnego rybonukleozydu (Ryc.5). Obie modyfikacje w niewielkim stopniu zmieniają właściwości biofizyczne RNA (Meier 2017).



Ryc. 5 Schemat przedstawiający reakcję pseudourydylacji (czerwony) i 2'-O-metylacji (zielony). Należy zauważyć, że choć przedstawiono je na tym samym nukleozydzie, są to niezależne reakcje modyfikacji (Meier 2017).

Warto tu dodać, że ciała Cajala pełnią również istotną rolę w składaniu funkcjonalnych jednostek spliceosomu, w tym kompleksu U4/U5*U6 snRNP (Staněk 2017). Niemniej jednak, pomimo ich zaangażowania w kluczowe procesy, takie jak dojrzewanie U snRNP czy składanie tri-snRNP, brak tych molekularnych kondensatów nie wydaje się wpływać na żywotność komórek zwierzęcych (Liu i wsp. 2009) ani roślinnych (Muñoz-Díaz i Sáez-Vásquez 2022). Prawdopodobnie możliwe jest to dzięki temu, że wiele procesów zachodzących w CB może być alternatywnie realizowanych w nukleoplazmie

w ich nieobecności. Nie zmienia to jednak faktu, że ciała Cajala funkcjonują jako „mikroreaktory” pozwalające na intensyfikację przeprowadzanych wewnątrz nich procesów. Możliwe jest to dzięki lokalnemu gromadzeniu, organizacji i częściowemu odseparowaniu enzymów i substratów zaangażowanych w określone reakcje biochemiczne (Taliany i wsp. 2023). Co ciekawe, choć CB mogą być zbędne dla przeżywalności większości komórek, istnieją przypadki, w których ich brak prowadzi do śmierci komórkowej, na przykład w komórkach embrionalnych myszy (Walker i wsp. 2009) oraz w komórkach danio pręgowanego (Strzelecka i wsp. 2010). Te wyjątki sugerują, że w specyficznych kontekstach fizjologicznych CB mogą odgrywać krytyczną rolę w funkcjonowaniu komórki.

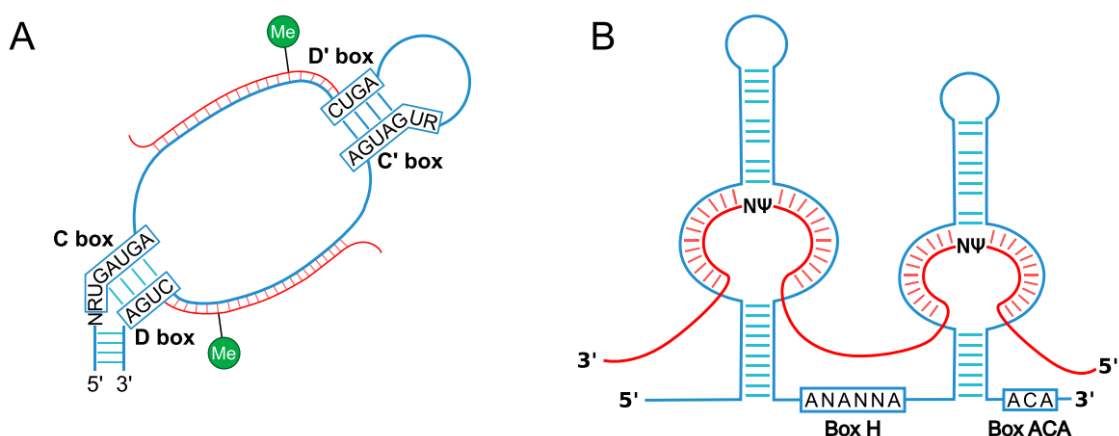
1.2.3.2 Przypuszczalna rola CB w biogenezie oraz akumulacji małych RNA

Inną klasą małych RNA występujących w ciałach Cajala są wspomniane już snoRNA i scaRNA, które kierują chemicznymi modyfikacjami innych RNA, głównie rRNA, tRNA i snRNA (Machyna i wsp. 2013).

snoRNA występują u wszystkich eukariontów i są najlepiej znane ze swojej roli w biogenezie rybosomów. Istnieją dwie główne klasy tych małych jąderkowych RNA, które różnią się motywami sekwencji, strukturą, białkami, z którymi wchodzi w interakcje, a co za tym idzie, rodzajem modyfikacji chemicznych, które katalizują. snoRNA z ramką C/D mają zwykle od 70 do 130 nukleotydów. Charakteryzują się obecnością motywów C (RUGAUGA) i D (CUGA), które znajdują się odpowiednio blisko końca 5' i 3' cząsteczki, gdzie wchodzi w niekanoniczne oddziaływania zasad tworząc strukturę typu „kink-turn” (Ryc.6A). Enzymatycznym składnikiem kompleksu rybonukleoproteinowego snoRNA C/D (snoRNP) jest fibrillaryna (metylotransferaza), która katalizuje 2'-O-metylację rybozy w cząsteczce docelowej. Dodatkowe motywy C' i D', o tych samych sekwencjach konsensusowych co motywy C i D, ale często mniej zachowane, znajdują się w środkowej części cząsteczki (Bergeron i wsp. 2021).

W przeciwieństwie do snoRNA C/D, snoRNA z ramką H/ACA są dłuższe (zwykle między 110 a 145 nukleotydów) i składają się z dwóch struktur spinki do włosów oddzielonych zawiasem lub motywem H box (ANANNA, gdzie N to dowolny nukleotyd), zakończonych

motywem ACA box znajdującym się 3 nukleotydy od końca 3' cząsteczki (Ryc.6B). SnoRNA H/ACA wchodzi w interakcje z czterema konserwatywnymi białkami, w tym dyskeriną (transferaza pseudourydynowa), która katalizuje modyfikację cząsteczki docelowej. Regiony antysensowne snoRNA H/ACA, które wykazują komplementarność do celu podzielone są na dwie części i znajdują się w pętlach w strukturze szpilek do włosów, precyzyjnie określając urydynę do pseudourydylacji (Bergeron i wsp. 2021).



Ryc. 6 Schematyczne przedstawienie struktury dwóch głównych klas snoRNA. A: Box C/D snoRNA: Charakteryzują się obecnością sekwencji C i D znajdujących się odpowiednio w pobliżu końców 5' i 3' cząsteczki. Sekwencje te wchodzi w niekanoniczne interakcje zasad, tworząc strukturę typu „kink-turn”. Dodatkowe sekwencje C' i D' mogą występować w środkowej części cząsteczki. Region antysensowny, zwany także regionem przewodnikowym, który łączy się z cząsteczką docelową poprzez parowanie zasad i wskazuje resztę modyfikowaną przez metylację (Me), znajduje się bezpośrednio powyżej sekwencji D' i/lub D. B: Box H/ACA snoRNA: Składają się z dwóch struktur typu szpilki do włosów, które są oddzielone sekwencją H (gdzie N oznacza dowolny nukleotyd), a kończą się sekwencją ACA, znajdującą się 3 nukleotydy przed końcem 3' cząsteczki. Regiony przewodnikowe, które określają pozycję w cząsteczce docelowej podlegającą pseudourydylacji (Ψ), znajdują się w wypukleniach w obrębie struktur typu szpilki do włosów (Bergeron i wsp. 2021).

Większość snoRNA lokalizuje się oraz pełni swoją funkcję w obrębie jąderka. Istnieje jednak wspomniana już podklasa snoRNA nazywana scaRNA, które lokalizują się w ciałach Cajala, gdzie odpowiadają przede wszystkim za modyfikacje chemiczne snRNA, co jest kluczowe dla ich prawidłowego dojrzewania (Meier 2017).

scaRNA występujące w dużej ilości w ciałach Cajala zawierają jeden lub oba motywy C/D, H/ACA. Chemiczne modyfikacje snRNA biorących udział w procesie splicingu, mają miejsce podczas ostatnich etapów ich dojrzewania, które zachodzą w obrębie CB. Modyfikacje te dotyczą obszarów snRNA istotnych dla interakcji z pre-mRNA, innymi snRNA lub białkami spliceosomu. Oddziaływania z różnorodnymi komponentami prowadzą z kolei do produkcji w pełni funkcjonalnych U snRNP, takich jak U2, U4/U6 i U4/U6-U5, które następnie uwalniane są z ciał Cajala do nukleoplazmy, aby spełniać swoją funkcję w procesie splicingu. Podjednostki niektórych wymienionych kompleksów ulegają oddysocjowaniu podczas procesu splicingu i mogą być ponownie kierowane do CB w celu ich regeneracji (recykling U snRNP). Ponieważ zarówno snoRNA, jak i scaRNA oraz związane z nimi białka współwystępują w ciałach Cajala, sugeruje się, że kondensaty te mogą odgrywać istotną rolę w dojrzewaniu tego typu RNP (Love i wsp. 2017).

1.2.3.3 Rola w biogenezie siRNA oraz miRNA

W różnych organizmach eukariotycznych mikroRNA (miRNA) i małe interferujące RNA (siRNA) regulują kluczowe procesy, takie jak inaktywacja mRNA, obrona przeciwwirusowa, modyfikacja chromatyny oraz wyciszanie transpozonów. Z przeprowadzonych badań wynika, że w komórkach roślinnych, zlokalizowane w pobliżu jąderka ciała Cajala są miejscami biogenezy siRNA i miRNA (Pontes i Pikaard 2008).

siRNA i miRNA to RNA o długości ~20–25 nukleotydów, zaangażowane w wyciszanie homologicznych genów lub ich transkryptów. miRNA zazwyczaj inaktywują mRNA istotne dla rozwoju, hamując ich translację lub powodując ich cięcie i degradację. Podobnie jak miRNA, siRNA mogą celować w homologiczne mRNA, prowadząc do ich cięcia i degradacji (Valencia-Sanchez i wsp. 2006). Jednak siRNA mogą również

powodować wyciszanie transkrypcyjne homologicznych sekwencji DNA (Grewal i Elgin 2007). U roślin, a prawdopodobnie także u ssaków, proces ten obejmuje mechanizm znany jako metylacja DNA kierowana przez RNA (*RNA-directed DNA methylation*) (Huettel i wsp. 2007).

W badaniach przeprowadzonych przez Logan i zespół wykazano, że ciała Cajala mogą łączyć się z grupą genów miRNA C19MC, co sugeruje ich rolę w biogenezie miRNA u zwierząt. Maszyny zaangażowane w tworzenie miRNA obejmuje kompleks Drosha/DGCR8, który przetwarza pierwotne miRNA do prekursorowego miRNA. Następnie przetwarzanie prekursorowego miRNA przez Dicer i inne komponenty prowadzi do powstania dojrzałego miRNA. Aby sprawdzić, czy ciała Cajala wpływają na ekspresję i dojrzewanie miRNA, zbadano dwa reprezentatywne miRNA (miR-520h i let-7a) w warunkach zaburzonego funkcjonowania CB. Dysfunkcja ciał powodowana była zmniejszeniem poziomu białek koiliny, SMN, TDP-43 (białko wiążące RNA, które kieruje niektóre scaRNA do CB) lub WRAP53 (białko odgrywające rolę w formowaniu scaRNP i telomerazy). Co istotne, zmiany w poziomach miRNA były różne w zależności od tego, które białko występowało w zmniejszonej ilości. Zburzenie funkcji ciał wiązało się ze zmianami w poziomie pierwotnego i dojrzałego miRNA. Wyniki tych badań zdają się potwierdzać rolę ciał Cajala w regulacji ekspresji miRNA (Logan i wsp. 2020).

Badania przeprowadzone przez Li i zespół wskazują na to, że centra przetwarzania siRNA (identyfikowane poprzez lokalizację DCL3/AGO4) odpowiadają ciałom Cajala (Li i wsp. 2006). Białko DCL3 odpowiada za generowanie siRNA o długości 24. SiRNA powstają bowiem z dwuniciowego RNA (dsRNA), które DCL3 rozcina na mniejsze 24 nt fragment (Taochy i wsp. 2019), z kolei białko AGO4 jest integralną częścią kompleksu RISC, który łączy się z siRNA generowanymi przez DCL3. Po związaniu AGO4 z siRNA, kieruje on procesem wyciszania komplementarnych sekwencji DNA. Oba te białka odgrywają istotną rolę w biogenezie funkcjonalnych siRNA u roślin (Taochy i wsp. 2019).

Hipoteza dotycząca tego, że to ciała Cajala są centrami przetwarzania siRNA została przetestowana za pomocą przeciwciał rozpoznających kilka markerów ciał Cajala, w tym czapeczkę TMG obecną 5' końcu U snRNA, białko SmD3 oraz białko U2B", które łączy się z U2 snRNA. Wszystkie trzy markery lokalizowały się wspólnie z AGO4 w jąderkowym centrum przetwarzania siRNA. Uzyskane wyniki wskazywały zatem, że centrami przetwarzania siRNA są ciała Cajala, znajdujące się na obszarach peryferyjnych jąderka bądź też ciała znajdujące się w nukleoplazmie, ale będące w bezpośrednim sąsiedztwie tego kondensatu (Li i wsp. 2006; Li i wsp. 2008).

Co interesujące zespół Fujioka badając lokalizację białka DCL1 (roślinny enzym odpowiedzialny za podwójne cięcie pre-miRNA co prowadzi do powstania dojrzałego miRNA), którego obecność wykazano na peryferiach jąderek u *A.thaliana*, początkowo uznał, że białko to jest niezwiązane z CB ze względu na to, że nie kolokalizowało ze strukturami zawierającymi w koilinę. Niemniej jednak struktury wzbogacone o DCL1 kolokalizowały z białkami SmB i SmD3 snRN, co sugerowało, że jądra *Arabidopsis* zawierają ciała Cajala, które nie posiadają koiliny jak również ciała, które ją zawierają (Fujioka i wsp. 2007).

To interesujące obserwacje, które mogą wskazywać na to, że choć koilina jest niezwykle istotna dla prawidłowego formowania się ciał Cajala to możliwe, że po ich utworzeniu nie ma ona dużego wpływu na utrzymanie integralności istniejących kondensatów. Co więcej, jak twierdzą Pontes i Pikaard, wydaje się wysoce prawdopodobne, że istnieje wiele rodzajów ciał Cajala, biorąc pod uwagę ich różnorodne funkcje oraz różnice w zawartości poszczególnych komponentów (Pontes i Pikaard 2008). Takie podejście sugerowałoby potrzebę wprowadzenia dokładniejszej nomenklatury, która pozwalałaby na rozróżnienie poszczególnych typów ciał Cajala. Aby móc potwierdzić słuszność powyższych hipotez wymagane jest jednak przeprowadzenie dalszych badań, które szczegółowo zbadają skład molekularny, dynamikę oraz specyficzne funkcje różnych typów ciał Cajala w kontekście różnych komórek oraz warunków fizjologicznych.

1.2.3.4 Udział ciał Cajala w utrzymaniu długości telomerów

Enzymem odpowiedzialnym za wydłużanie telomerów, czyli powtarzalnych sekwencji DNA znajdujących się na końcach chromosomów jest telomeraza. Jest to kompleks rybonukleoproteinowy, który dokładnie odpowiada za syntezę sześci nukleotydowych powtórzeń na końcach telomerów. Dzięki utrzymaniu odpowiedniej długości tych struktur wspiera ona potencjał proliferacyjny komórek macierzystych, progenitorowych, a także nowotworowych. Telomeraza składa się z RNA telomerazy (TERC) – pełniącej rolę matrycy, na podstawie której enzym syntetyzuje powtórzenia telomerowe, odwrotnej transkryptazy telomerazy (TERT) – jest to białkowa część enzymu o aktywności odwrotnej transkryptazy, która katalizuje dodawanie nukleotydów na końcach chromosomów, a także białek pomocniczych. Do białek pomocniczych zaliczyć można dyskerinę, która wiąże TERC i stabilizuje cały kompleks oraz inne białka regulatorowe takie jak np. TCAB1, które wspomaga akumulację telomerazy w ciałach Cajala (Venteicher i Artandi 2009). TERC to scaRNA, zawierające zarówno sekwencję H/ACA box jak i CAB box. Przypuszcza się, że ciała Cajala mogą być zaangażowane w modyfikacje TERC, składanie podjednostek telomerazy oraz dostarczenie telomerazy do telomerów podczas fazy S cyklu komórkowego. Nie wiadomo jednak obecnie czy zaangażowanie ciał Cajala w powyższe procesy dotyczy jedynie komórek zwierzęcych czy może podobne procesy mają miejsce również w komórkach roślinnych.

U ludzi lokalizacja telomerazy w ciałach Cajala jest kluczowa dla utrzymania długości telomerów. Wykazano, że mutacja punktowa w motywie CAB w RNA telomerazy lub zahamowanie ekspresji TCAB1 wpływają na zmianę lokalizacji TERC i nieefektywną syntezę telomerów przez telomerazę. Na chwilę obecną nie znana jest odpowiedź na pytanie: co dokładnie ciała Cajala wnoszą dla funkcji telomerazy?

Jedną z hipotez jest to, że stanowią one po prostu magazyn dla innych, nieodkrytych jeszcze czynników telomerazy. Alternatywna hipoteza zakłada z kolei, że ciała Cajala działają jak centra dystrybucji: po złożeniu enzymu telomeraza może być transportowana do telomerów właśnie z udziałem tych struktur. Białko TCAB1

może pełnić funkcję molekularnego łącznika, który wiąże telomerazę z telomerami. Dotychczas przeprowadzone badania mikroskopowe wykazały, że ciała Cajala kontaktują się z wybranym zestawem telomerów, dostarczając do nich TERC, szczególnie w fazie S cyklu komórkowego. W tym modelu TCAB1 odpowiadałoby za wspieranie transportu lub zatrzymanie telomerazy w ciałach Cajala (Jady i wsp. 2006; Tomlinson i wsp. 2006).

1.2.3.5 Udział CB w odpowiedzi na stres abiotyczny oraz biotyczny

Jak opisano dotychczas ciała Cajala mają również istotny udział w odpowiedzi na stres zarówno abiotyczny jak i biotyczny. Czynnikiem indukującym stres abiotyczny mogą być ekstremalne temperatury, metale ciężkie, deficyt lub nadmiar wody, szok osmotyczny, wysokie zasolenie czy promieniowanie ultrafioletowe. Z kolei stres biotyczny wywołują szkodniki oraz patogeny. Komórki szybko reagują na stres na różne sposoby, zmieniając swój metabolizm, aby aktywować szlaki przeżycia lub zapoczątkować mechanizmy śmierci komórkowej w wyniku apoptozy, które ostatecznie eliminują uszkodzone komórki. Stres często prowadzi również do zahamowania kluczowych procesów jądrowych takich jak replikacja DNA czy transkrypcja, a także powoduje reorganizację struktury i architektury jądra (Boulon i wsp. 2010).

Obecnie wiadomo, że regulacja odpowiedzi na różne stresy abiotyczne u roślin jest złożona i wielowątkowa oraz że w regulacji tej bierze udział wiele roślinnych hormonów, takich jak kwas salicylowy (SA) czy etylen (Bita i Gerats 2013). Wiele badań wskazuje jednak również na istotną rolę ciał Cajala w regulacji tolerancji na stres abiotyczny. W badaniach przeprowadzonych przez Górkę oraz zespół odkryto, że u mutantów *A.thalina* pozbawionych ciał Cajala (nbc-1), dochodzi do zmniejszenia tolerancji na hipoksję (niedobór tlenu) w porównaniu do roślin typu dzikiego (Górka i wsp. 2022). Ponad to w komórkach mutantu dochodziło do zaburzeń w biogenezie etylenu, który odgrywa istotną rolę w regulowaniu odpowiedzi na stres hipoksji. Zahamowanie produkcji etylenu, mogłoby spowodowane obniżeniem poziomu transkrypcji genów zaangażowanych w biosyntezę etylenu (jako efekt braku CB). Co dalej skutkowało opóźnionym przejściem na oddychanie beztlenowe komórek,

skutkując zmniejszoną tolerancją na stres hipoksji (Górka i wsp. 2022). Dane te wskazują na istotny udział CB w regulacji tolerancji na stres abiotyczny.

Z drugiej strony, w niektórych systemach, koilina lub CB mogą działać jako negatywne regulatory tolerancji na stresy abiotyczne. W badaniach przeprowadzonych przez Love i zespół liście transgeniczných oraz nietransgeniczných roślin tytoniu, w których zablokowano ekspresję koiliny, traktowano zwiększonymi stężeniami soli (NaCl). Ekspozycja komórek roślinnych na wysokie stężenie soli może wywołać szok osmotyczny, zaburzenia równowagi jonowej komórek oraz stres oksydacyjny, które objawiają się zwiększoną produkcją H_2O_2 , akumulacją markerów programowanej śmierci komórkowej (PCD), wypływem cytochromu c do cytoplazmy oraz wybieleniem liści (Love i wsp. 2017). W nietransgeniczných liściach sól spowodowała ich wybielenie a następnie obumieranie, natomiast w liściach transgeniczných, pozbawionych koiliny, zaobserwowano lepszą żywotność (ograniczone wybielenie) oraz mniejszą akumulację H_2O_2 . Dane te sugerują, że tłumienie ekspresji genu kodującego koilinę może zwiększać tolerancję na sól (Love i wsp. 2017). Szlaki sygnalizacyjne stresu w roślinach obejmują złożone procesy, a ciała Cajala lub koilina wydają się być wcześniej nierozpoznanym głównym graczem w tych szlakach. Zatem oprócz swojej podstawowej roli w metabolizmie RNA i biogenezie RNP, CB mogą pełnić dodatkowe funkcje w roślinnej odpowiedzi na stres, jednak dokładne mechanizmy leżące u podstaw tych zjawisk pozostają niejasne.

Badania dotyczące roślinnego wirusa mozaiki orzechów ziemnych (*ang. Groundnut rosette virus*, GRV) wykazały, że wytwarzane przez ten wirus białko ORF3 trafia do ciał Cajala i promuje ich reorganizację. Choć mechanizm ten nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, to przypuszcza się, że ORF3 przechwytuje i zmienia istniejące ścieżki transportu i dystrybucji ciał Cajala, modyfikując ich funkcję i formę. Proces ten obejmuje m.in. redystrybucję kluczowych komponentów ciał Cajala, takich jak koilina, fibrillaryna i U2B", poprzez modulowanie fosforylacji koiliny lub interakcji składników ciał Cajala z innymi elementami jąderkowymi. ORF3 ostatecznie przemieszcza się z jądra do cytoplazmy, transportując fibrillarynę do cytoplazmy, gdzie normalnie nie występuje. Fibrillaryna prawdopodobnie uczestniczy w tworzeniu

filamentowych RNP w cytoplazmie, co umożliwia systemowy transport wirusa na duże odległości (Ryabov i wsp. 2003).

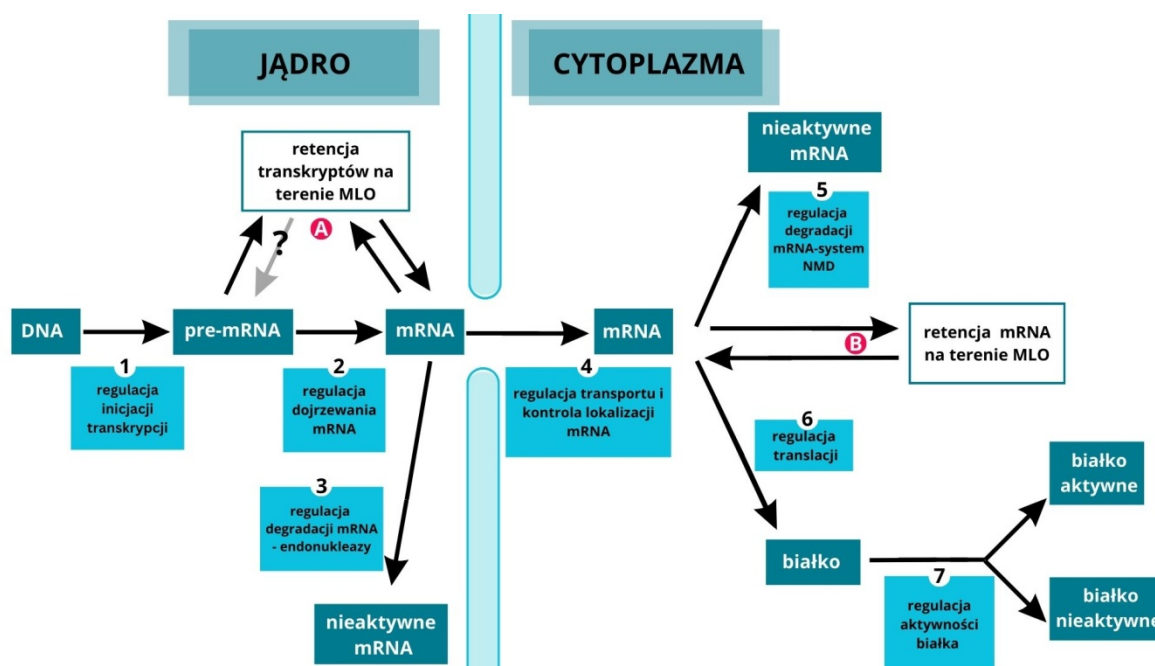
Aby lepiej zrozumieć rolę ciał Cajala w szlakach infekcyjnych wirusów roślinnych, Shaw i zespół przeprowadzili knockdown koiliny w roślinach tytoniu (*Nicotiana*). Stwierdzono, że zmniejszenie poziomu koiliny może różnicować odpowiedzi roślin na różne taksony wirusów. Na przykład, obniżenie poziomu koiliny zwiększało akumulację wirusa smugowatości jęczmienia (BSMV) oraz wirusa złotej mozaiki pomidora (TGMV), co mogło jednocześnie sprzyjać ich rozprzestrzenianiu się (Shaw i wsp. 2014). Wyniki te wskazują na to, że koilina/ciała Cajla odgrywają istotną rolę w regulacji patogenezы wirusów roślinnych, choć dokładne mechanizmy tych procesów wymagają dalszych badań.

Jedną z potencjalnych funkcji koiliny może być bezpośrednia interakcja z białkami wirusowymi, jak wykazano w przypadku białek wirusa *poa semilatent*, który jest blisko spokrewniony z wirusem (BSMV). Dane te sugerują, że koilina (i CB) może pełnić nowe funkcje, które są albo wykorzystywane przez wirusy roślinne dla ich własnych korzyści, albo zaangażowane w obronne reakcje antywirusowe roślin (Semashko i wsp. 2012). Wynik infekcji wirusowej jest wypadkową wyścigu między obroną gospodarza a replikacją i rozprzestrzenianiem się wirusa. Funkcje koiliny czy samych ciał Cajala mogą wpływać na jedną lub drugą stronę tego wyścigu.

1.3 Regulacja ekspresji genów kodujących białka w komórkach eukariotycznych

Genom komórki zawiera w swojej sekwencji DNA informacje niezbędne do syntezy tysięcy różnych białek i cząsteczek RNA. Mimo to komórki wyrażają jedynie ściśle określony dla siebie zestaw genów, co umożliwia powstawanie różnych typów komórek w organizmach wielokomórkowych. Ponad to ekspresja genów w komórkach może zmieniać się w odpowiedzi na sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego, w tym bodźce od innych komórek. Wielopoziomowa regulacja ekspresji genów jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania i różnicowania się komórek. Może ona zachodzić na różnych etapach drogi od genu do białka, przy czym za kluczowy etap uznaje się inicjację transkrypcji RNA. To właśnie w tym momencie podejmowana jest

decyzja o tym, czy dany gen ma ulegać ekspresji. Regulacja na późniejszych etapach, takich jak dojrzewanie RNA, jego transport, translacja czy modyfikacje potranslacyjne, pełni głównie funkcję modulującą poziom ekspresji. Prawidłowa regulacja wszystkich etapów, od transkrypcji aż do uzyskania funkcjonalnego białka, jest fundamentalna dla utrzymania homeostazy, a także specjalizacji komórek.



Ryc. 7 Schematyczne przedstawienie 7 głównych etapów regulacji ekspresji genów u eukariontów. A - retencja w obrębie jądrowych kondensatów. B- retencja w obrębie cytoplazmatycznych kondensatów.

1.3.1 Włączanie lub wyłączenie ekspresji genu – czyli regulacja zachodzenia procesu transkrypcji

Pierwszym etapem ekspresji genu podlegającym regulacji jest jego transkrypcja. Aby dany gen ulegał ekspresji musi być on przede wszystkim dostępny dla całej maszynierii niezbędnej dla przeprowadzenia procesu transkrypcji. Ogólne czynniki transkrypcyjne eukariontów i polimeraza RNA nie są w stanie samodzielnie związać się z promotorem związanym z nukleosomem. W związku z tym, oprócz kierowania składaniem maszynierii transkrypcyjnej na promotorze, aktywatory transkrypcji wspomagają transkrypcję poprzez inicjowanie zmian w strukturze chromatyny w obrębie promotorów, co sprawia, że sekwencje te stają się bardziej dostępne.

Do najważniejszych sposobów lokalnych zmian w chromatynie zalicza się kowalencyjne modyfikacje histonów, remodelowanie nukleosomów, usuwanie nukleosomów oraz wymianę histonów. Aktywatory transkrypcji wykorzystują wszystkie te mechanizmy: przyciągają one koaktywatory, które obejmują enzymy modyfikujące histony, kompleksy remodelujące chromatynę zależne od ATP oraz chaperony histonowe, z których każdy może zmieniać strukturę chromatyny (Mansisidor i Risca 2022). Często jest tak, że to bezpośrednie chemiczne modyfikacje DNA przyczyniają się do modyfikacji w obrębie histonów, co wpływa na zmianę stopnia kondensacji chromatyny. Na przykład metylacja DNA indukuje deacetylację histonów przez enzymy HDAC, co ostatecznie prowadzi do kondensacji chromatyny i represji genów (Gallinari i wsp. 2007). Te lokalne zmiany w strukturze chromatyny zapewniają większy dostęp do DNA, ułatwiając tym samym montaż ogólnych czynników transkrypcyjnych na promotorze (Turner 2014). Poza zmianą dostępności genu dla maszynery transkrypcyjnej, bardzo istotny wpływ na inicjację procesu transkrypcji mają także: obecność białek regulatorowych (wspomniane już aktywatory oraz represory transkrypcji), odległość sekwencji genu od sekwencji wzmacniających, dostępność czynników transkrypcyjnych w tym elementów kompleksu TREX czy samej polimerazy RNA II. W kontekście odległości sekwencji wzmacniających od promotorów genów warto zaznaczyć, że początkowe założenia dotyczące tego, iż wymagany jest bezpośredni kontakt odległych wzmacniaczy z docelowym promotorem ostatecznie okazały się niesłuszne. Próby zmierzenia odległości między aktywnymi wzmacniaczami a ich docelowymi promotorami przeprowadzone przez Alexander i zespół sugerują występowanie zaskakująco dużych odległości, rzędu kilku setek nm. Wyniki badań przeprowadzonych przez ten zespół wskazują na to, że bliskość jest niezbędna, aby odległy wzmacniacz aktywował swój gen docelowy. Jednak bliskość nie oznacza ich bezpośredniego kontaktu (Alexander i wsp. 2019).

1.3.2 Ko-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów

Po zainicjowaniu procesu transkrypcji, rozpoczyna się etap elongacji, który również może podlegać modulacji. Badania dotyczące elongacji transkrypcji ujawniły istnienie kilku rodzin czynników elongacyjnych, które regulują aktywność polimerazy II zarówno pozytywnie, jak i negatywnie. Pozytywna regulacja elongacji opiera się na zmianie stopnia fosforylacji domeny CTD w obrębie polimerazy II. P-TEFb jest najlepiej scharakteryzowanym pozytywnym czynnikiem elongacyjnym, który posiada aktywność kinazy białkowej. Ułatwia on przejście od wczesnej do późnej, produktywnej fazy elongacji, poprzez zmianę stopnia fosforylacji domeny CTD w obrębie pol II RNA (Price 2000). Obecnie zidentyfikowano i scharakteryzowano również dwa negatywne czynniki elongacji transkrypcyjnej DSIF oraz NELF. Jak wykazano czynniki te współdziałają ze sobą i wiążą się bezpośrednio z polimerazą RNA II powodując jej pauzowanie, co skutkuje zahamowaniem elongacji transkrypcji, a więc również ekspresji docelowego genu (Yamaguchi i wsp. 1999).

Tuż po inicjacji procesu transkrypcji koniec 5' nowopowstałego transkryptu podlega unikalnej ko-transkrypcyjnej modyfikacji polegającej na dodaniu do niego metylowanej czapeczki guanozyny. Czapeczka mRNA blokuje degradację mediowaną przez egz nukleazy 5'-3' oraz rekrutuje specyficzne czynniki odpowiedzialne za dojrzewanie RNA, jego eksport i translację. Usunięcie czapeczki inicjuje z kolei degradację mRNA. Efektywność zachodzenia procesów związanych z modyfikacją końca 5' nowopowstałych transkryptów będzie miała zatem bezpośredni wpływ na regulację poziomu ekspresji danego genu (Galloway i Cowling 2019). Podobne jest w przypadku procesów związanych z dojrzewaniem końca 3' transkryptów, które obejmuje 2 główne etapy: cięcie endonukleolityczne w obrębie 3' końca oraz dodawanie ogona poli(A). Efektywność wiązania kompleksów białkowych z określonymi elementami na końcu 3' pre-mRNA będzie wpływała na specyficzność i efektywność przetwarzania końców 3' a co za tym idzie na ostateczny poziom funkcjonalnych, dojrzałych i zdolnych do eksportu na teren cytoplazmy cząsteczek mRNA. Warto podkreślić, że regulacja poziomu ekspresji genów powodowana wspomnianymi mechanizmami nie jest

ukierunkowana na ściśle określone geny. Oznacza to, że mechanizmy te wpływają w równym stopniu na ekspresję wszystkich aktywnych genów na które oddziałują.

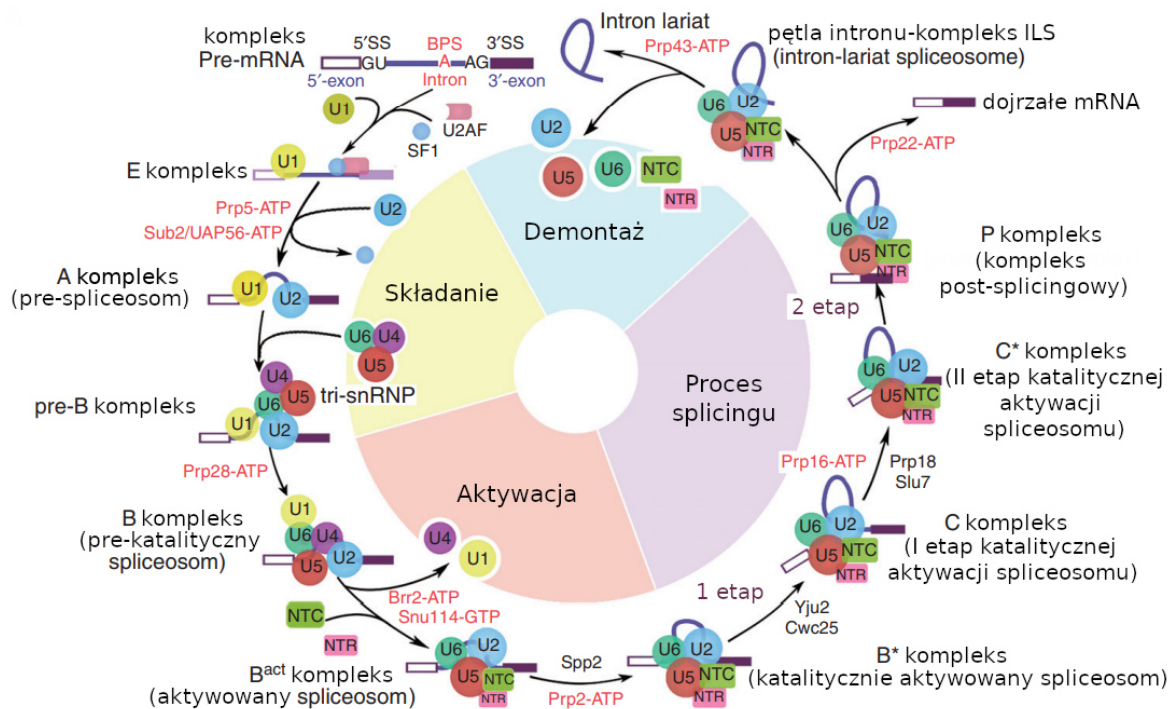
Z uwagi na mechanizm regulacji ekspresji genów jaki obserwowany jest w badanym modelu, szczególną uwagę pragnę jednak zwrócić na proces, który zachodzi pomiędzy dojrzewaniem końca 5' a końca 3' mRNA. Mowa tutaj o ko-transkrypcyjnym wycinaniu sekwencji niekodujących w obrębie syntetyzowanych mRNA.

1.3.3 Proces splicingu oraz dostępność czynników splicingowych jako kolejny etap regulacji ekspresji genów

Geny bakteryjne składają się zazwyczaj z ciągłej sekwencji kodującego DNA, która jest bezpośrednio transkrybowana na mRNA. W przeciwieństwie do genów eukariotycznych, które podzielone są na fragmenty sekwencji kodujących (eksony), które przeplatane są znacznie dłuższymi sekwencjami niekodującymi (introny). W rezultacie, część kodująca genu eukariotycznego często stanowi jedynie niewielką część długości całego genu. Zarówno sekwencje intronowe, jak i eksonowe są transkrybowane na RNA. Sekwencje intronowe są jednak ostatecznie usuwane z nowo zsyntetyzowanego pre-mRNA w procesie ko-transkrypcyjnego splicingu. Dojrzałym mRNA nazywane jest takie RNA, którego końce 5' oraz 3' poddano odpowiedniej obróbce a sekwencje intronowe zostały usunięte w procesie splicingu. Prawidłowe rozpoznawanie i usuwanie intronów przez maszynę splicingową stanowi istotny oraz niezmienny etap ekspresji genów u wszystkich eukariontów.

Wstępne rozpoznanie miejsc splicingowych następuje poprzez wiązanie U1 snRNP z 5' miejscem splicingowym (5' ss) oraz interakcję czynnika splicingowego 1 (SF1, znanego również jako białko wiążące punkt rozgałęzienia u ssaków, mBBP) oraz czynnika pomocniczego U2 (U2AF) z punktem rozgałęzienia i szlakiem polipirymidynowym (Ryc.8). Następnie U2 snRNP wypiera SF1 i wiąże się bezpośrednio z punktem rozgałęzienia, tworząc tzw. kompleks pre-spliceosomalny, nazywany kompleksem A (Yan i wsp. 2019; Fica 2020). Kolejnym krokiem jest dołączenie U4/U6/U5 tri-snRNP do pozostałych U snRNP, co prowadzi do powstania dużego i złożonego pre-katalizacyjnego kompleksu spliceosomalnego, określanego jako kompleks B. Po serii

reorganizacji i wymiany białek oraz usunięciu U1i U4 snRNP, aktywny spliceosom (B*) gotowy jest do przeprowadzenia pierwszej reakcji transestryfikacji w procesie splicingu. Powstały kompleks C katalizuje drugi etap splicingu, prowadząc do wycięcia intronu w formie pętli (lariat) i połączenia ze sobą eksonów (Yan i wsp. 2019). Oprócz rdzeniowych czynników splicingowych, dodatkowe białka wiążące RNA (RBPs) modulują rozpoznawanie eksonów i intronów, wzmacniając lub wyciszając splicing w zależności od kontekstu sekwencji, z którą są związane (Fu i Ares 2014).



Ryc. 8 Cykl splicingu pre-mRNA oraz główne elementy spliceosomu. Każdy cykl obejmuje trzy fazy: składanie i aktywację spliceosomu (żółta oraz czerwona część diagramu), przeprowadzenie reakcji splicingu (fioletowa część diagramu) oraz demontaż spliceosomu (niebieska część diagramu). Kompleks pre-B reprezentuje pierwszy w pełni złożony spliceosom, w którym obecne są wszystkie pięć U snRNP i 5' SS jest nadal rozpoznawane przez U1 snRNP. Oprócz kompleksu pre-B, złożony spliceosom występuje w siedmiu różniących się składem stanach: B, Bact, B*, C, C*, P oraz spliceosomie z pętlą intronu (ang. intron lariat spliceosome, ILS). Jednokierunkowa konwersja każdego z tych sąsiednich kompleksów spliceosomowych do następnego jest napędzana przez konserwowane ATP-azy/helicazy; Brr2 (B-do-Bact), Prp2 (Bact-do-B*), Prp16 (C-do-C*) i Prp22 (P-do-ILS). Czynniki splicingowe Cwc25 i Yju2 ułatwiają reakcję tworzenia pętli,

podczas, gdy Prp18 i Slu7 wspomagają ligację eksonów. Na koniec cyklu demontaż kompleksu ILS jest przeprowadzany przez ATP-azę/helicazę Prp43 (Yan i wsp. 2019 - zmodyfikowano).

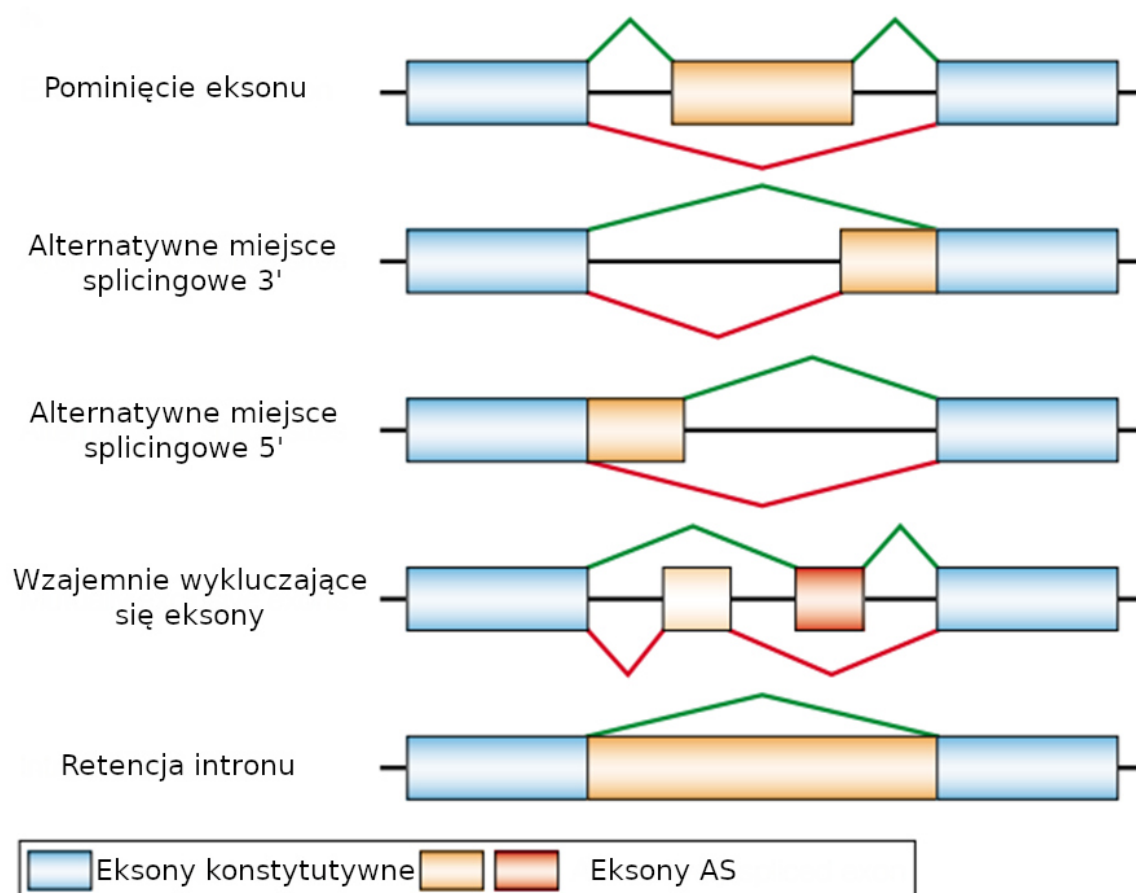
Badania polegające na sekwencjonowaniu nowo powstającego RNA pozwoliły na oszacowanie, że ko-transkrypcyjny splicing w ludzkich komórkach występuje z częstością 74–85% i jest zjawiskiem szeroko rozpowszechnionym (Neugebauer 2019). Najnowsze badania wykazały, że splicing jest przeprowadzany niemal natychmiastowo po ukończonej syntezie intronów u drożdży (Oesterreich i wsp. 2016), podczas gdy dokładny czas tego procesu w organizmach ssaków jest nadal przedmiotem dyskusji. Ponieważ szybkość transkrypcji może modulować splicing, prawdopodobne jest, że w większości przypadków spliceosom montuje się wkrótce po transkrypcji intronów, podczas gdy usunięcie intronów może nastąpić natychmiast lub w późniejszym czasie, w zależności od siły miejsca splicingowego czy sąsiadujących sekwencji cis-regulatorowych. Wiele faktów wskazuje na to, że splicing pre-mRNA nie jest zdarzeniem izolowanym i jest ściśle powiązany z transkrypcyjnym oraz epigenetycznym środowiskiem danego genu. Ostateczny wybór miejsca splicingu będzie zatem zależał od skoordynowanej aktywności wielu czynników (Yan i wsp. 2019)

1.3.4 Alternatywny splicing (AS) jako narzędzie służące regulacji syntezy alternatywnych izoform mRNA

Nieciągła struktura eksonowo-intronowa genów eukariotycznych umożliwia powstawanie alternatywnych izoform mRNA. W tym procesie eksony pre-mRNA mogą być składane w różny sposób, na przykład poprzez pomijanie jednego lub kilku eksonów albo wykorzystanie alternatywnych miejsc splicingu (Lee i Rio 2015). Alternatywne warianty splicingu jednego genu mogą kodować różne izoformy białek, które w skrajnych przypadkach mogą nawet pełnić przeciwstawne funkcje (Schwerk i Schulze-Osthoff 2005). Występowanie alternatywnego splicingu otwiera kolejny poziom dla regulacji genów i odpowiada za niezwykłą różnorodność transkryptomu i proteomu u metazoa (Nilsen i Graveley 2010). Spośród wszystkich ludzkich genów ponad 90% podlega alternatywnemu splicingowi (Wang i wsp. 2008). Jest

on regulowany przede wszystkim przez interakcje białek wiążących RNA oraz czynników splicingowych z sekwencjami w pre-mRNA, jak również przez parowanie zasad między komplementarnymi sekwencjami RNA (Lee i Rio 2015).

Wyróżnia się pięć głównych zdarzeń AS : pominięcie eksonu, alternatywne miejsce splicingowe 3', alternatywne miejsce splicingowe 5', wzajemnie wykluczające się eksony i retencję intronów (*ang. intron retention*, IR) (Ryc.9). Retencja intronów jest najstabilniej poznaną formą AS w komórkach ssaków. W większości przypadków dojrzałe izoformy mRNA, w których introny zostały całkowicie usunięte, są eksportowane z jądra do cytoplazmy w celu translacji (Cuenca-Bono i wsp. 2011; Majewska i wsp. 2021; Rudzka i wsp. 2022). Ponieważ introny często zawierają przedwczesne kodony terminacji (PTC), izoformy z zachowanymi intronami (*ang. intron retention isoforms*, IRI) są często szybko degradowane przez mechanizm NMD, który jest aktywowany przez PTC (Ge i Porse 2013). IRI mogą być zatrzymywane w jądrze lub cytoplazmie i podlegać dalszemu splicingowi w odpowiedzi na określone bodźce lub stres (post-transkrypcyjny splicing) (Naro i wsp. 2017). IRI mogą również unikać mechanizmu NMD (Lykke-Andersen i Jensen 2015) i być tłumaczone na izoformy białkowe, które często są krótsze niż białko powstające na bazie dojrzałego mRNA (Ottens i Gehring 2016).



Ryc. 9 Pięć głównych zdarzeń alternatywnego splicingu. W każdym przypadku jedna alternatywna ścieżka splicingu jest oznaczona na zielono, a druga na czerwono. W ostatnim przykładzie alternatywna ścieżka polega na braku splicingu. W przypadku złożonych pre-mRNA, więcej niż jedna z tych form alternatywnego splicingu może dotyczyć różnych obszarów transkryptu, a dodatkowe izoformy mRNA mogą być generowane poprzez użycie alternatywnych promotorów lub miejsc poliadenylacji (Cartegni i wsp. 2002).

W przypadku roślin, mechanizmy regulujące alternatywny splicing również są w dużej mierze nieznane, jednak liczne doniesienia wskazują na kluczową rolę białek SR w składaniu spliceosomu i regulowanym splicingu (Reddy 2007). Ustalono także, że najczęściej występującym typem alternatywnego splicingu u roślin jest właśnie retencja intronu — może ona stanowić nawet 41% przypadków AS (Barbazuk i wsp. 2008). Najnowsze badania sugerują, że alternatywny splicing u roślin jest istotnym mechanizmem regulacyjnym na poziomie potranskrypcyjnym, wpływającym

na ekspresję genów, a ostatecznie na prawidłowy rozwój oraz funkcjonowanie roślin (Reddy 2007).

1.3.5 Regulacja poziomu ekspresji genu na etapie post-transkrypcyjnym

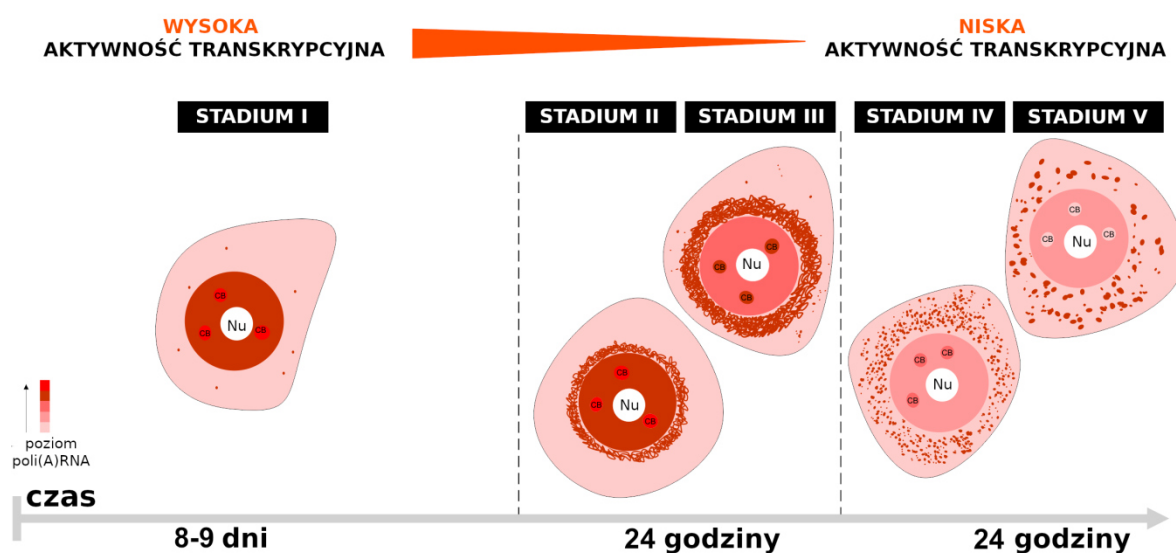
Po zakończonej transkrypcji część transkryptów np. tych wadliwych czy posiadających retencyjne introny podlega jądrowej degradacji lub akumulacji na terenie jądrowych MLO, o czym już wspomiano. Większość dojrzałych oraz funkcjonalnych kompleksów mRNP jest eksportowanych z jądra na teren cytoplazmy po to by ostatecznie ulec translacji (Singh i wsp. 2015). Eksport odbywa się dzięki działaniu specyficznych receptorów eksportu mRNA, które pośredniczą w interakcjach z kompleksem poru jądrowego (Natalizio i Went 2013). Po dotarciu do cytoplazmy mRNA może obrać różne drogi: (1) jego sekwencja nukleotydowa może zostać przetłumaczona na sekwencję aminokwasową kodowanego białka, (2) może ulegać akumulacji oraz przechowaniu w ciałach cytoplazmatycznych (odroczenie w czasie procesu translacji) lub (3) może być skierowany na drogę degradacji (Schoenberg i Maquat 2012; Buxbaum i wsp. 2015). Wszystkie te etapy mogą podlegać regulacji przez co mają fundamentalne znaczenie dla ekspresji genów.

Ze względu na specyfikę badanego modelu w kolejnym podrozdziale szczególna uwaga poświęcona zostanie jednak dotychczasowym doniesieniom na temat roli molekularnych kondensatów w regulacji ekspresji genów.

1.3.6 Udział ciał Cajala w regulacji ekspresji genów poprzez jądrową retencję transkryptów w komórkach roślinnych

Badania przeprowadzone na mikrosporocytach modrzewia europejskiego ujawniły istnienie nowej, nie opisanej do tej pory, roli ciał Cajala w komórkach roślinnych. Dotyczy ona regulacji ekspresji genów poprzez retencję transkryptów na terenie jądra. Zjawisko to obserwuje się w komórkach linii generatywnej podczas fazy diplotenu w pierwszego podziału mejotycznego, która trwa w tym przypadku około pięciu miesięcy. Diploten, który u tego gatunku trwa około pięciu miesięcy, to okres intensywnego wzrostu mikrosporocytów, związany z syntezą i akumulacją różnych RNA oraz białek. W tym długim okresie mikrosporocyty zwiększają swoją objętość

ponad trzykrotnie. Komórki, w których zaobserwowano zachodzenie tego zjawiska, charakteryzują się dodatkowo nietypowym wzorcem aktywności transkrypcyjnej. Obserwuje się w nich występowanie pulsów aktywności transkrypcyjnej, które korelują z cyklami zwiększonych poziomów poli(A)RNA (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015). Zbadano, że kolokalizacja jądrowych poli(A)RNA z nowo powstałymi transkryptami jest stosunkowo niska w środkowym diplotenie (21% całkowitej puli poli(A)RNA) co sugeruje występowanie jądrowej retencji poli(A)RNA w tym okresie. Obserwowana globalna retencja transkryptów wiąże się z ich akumulacją na terenie nukleoplazmy oraz ciał Cajala, przy czym CB pełnią funkcję przedziału jądrowego, w którym poli(A)RNA, zatrzymywane są przez dłuższy czas (rzędu kilku dni) (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015; Rudzka i wsp. 2022). CB wydają się zatem odgrywać istotną rolę w jądrowym zatrzymywaniu mRNA oraz w późniejszym eksporcie tych transkryptów do cytoplazmy. Dodatkowo szczegółowa analiza metabolizmu poli(A)RNA wykazała występowanie charakterystycznych zmian w ich rozmieszczeniu co pozwoliło na wyróżnienie pięciu stadiów cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA (Ryc.10)(Rudzka i wsp.2022).



Ryc. 10 Stadia cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Poliadenylowane transkrypty są zlokalizowane niemal wyłącznie w jądrze komórkowym (zarówno w nukleoplazmie, jak i w ciałach Cajala) podczas stadium 1, w którym zachodzi transkrypcja. W stadium 2 i 3 poli(A)RNA jest transportowane do cytoplazmy; w pierwszym z nich nadal występuje

w dużych ilościach w jądrze, natomiast w kolejnym większość jest już eksportowana. Stadia 4 i 5 charakteryzują się niskim poziomem poli(A)RNA w nukleoplazmie i wysokim poziomem w cytoplazmie, a w stadium 5 nie występuje już poliadenylowane RNA w ciałach Cajala. CB — ciało Cajala (ang. Cajal body), Nu — jąderko (ang. nucleolus). (Majewska i wsp. 2021 - zmieniono).

Do tej pory ustalono również, że transkrypty podlegające akumulacji w CB to mRNA kodujące białka. Wśród nich znajdują się transkrypty genów metabolizmu podstawowego tj. m.in. kodujące metylotransferazę pektynową, syntazę ATP, katalazę, peroksydazę i α -tubulinę. Oprócz nich zlokalizowano również mRNA kodujące białka powszechnie występujące w CB, takie jak białka Sm: SmD1, SmD2 i SmE, a także mRNA kodujące podjednostki polimerazy RNA II: RPB2 i RPB10 (Smoliński i Kołowerzo 2012; Rudzka i wsp. 2022).

Badania dotyczące stopnia dojrzałości retencyjnych mRNA przeprowadzone do tej pory wykazały, że transkrypty kodujące białka Sm są zatrzymywane w jądrze mikrosporocytów w formie niedojrzałej (Rudzka i wsp. 2022). W przypadku pre-mRNA SmD1, składającego się z trzech eksonów i dwóch intronów, wykryto silne sygnały w nukleoplazmie, jak również w CB, dla form pre-mRNA posiadających niewycięty intron 1 oraz intron 2 (Rudzka i wsp. 2022). Natomiast w przypadku pre-mRNA kodującego białka SmD2 i SmG, na które składają się po cztery eksony i trzy introny, w każdym z nich jeden intron okazał się być retencyjnym (Rudzka i wsp. 2022). Pozostałe introny analizowanych transkryptów najprawdopodobniej wycinane są ko-transkrypcyjnie. Ustalono zatem, że transkrypty zawierające retencyjne introny ulegają akumulacji na terenie jądra w obrębie nukleoplazmy oraz CB. Co więcej jest wysoce prawdopodobne, że to właśnie obecność „niewyciętych” sekwencji intronowych decyduje o retencji takich transkryptów i ich akumulacji na terenie ciał Cajala (Rudzka i wsp. 2022).

Powyższe doniesienia potwierdzono dodatkowymi analizami tj. poprzez absolutną kwantyfikację transkryptów SmG przy użyciu RT-qPCR. Przeprowadzona analiza ilościowa wykazała, że liczba kopii niedojrzałej formy mRNA w stadium 1 nieznacznie wzrasta, co może wskazywać na trwającą syntezę nowych mRNA. W późniejszych

stadiach liczba kopii tego RNA stopniowo malała. Dane te są zatem zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach *in situ* (Rudzka i wsp. 2022).

Ponad to przeprowadzona analiza dystrybucji dojrzałej formy mRNA SmG podczas pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA wykazała, że forma ta nie ulega akumulacji na terenie CB (Rudzka i wsp. 2022). Obecność w pełni dojrzałych transkryptów na terenie nukleoplazmy zaobserwowano już w stadium 1. W późniejszych stadiach wykryto obecność dojrzałych mRNA zarówno na terenie jądra jak i cytoplazmy. W stadium drugim obserwowano ich obecność w jądrze oraz cytoplazmie, a następnie gwałtowny spadek intensywności fluorescencji w jądrze na korzyść sygnału cytoplazmatycznego. Na tej podstawie wysunięto następującą hipotezę: wycinanie retencyjnych intronów ma miejsce najprawdopodobniej natychmiast po uwolnieniu transkryptów z ciał Cajala i tuż przed ich eksportem do cytoplazmy. Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone poprzez absolutną kwantyfikację qPCR (Rudzka i wsp. 2022).

Powyższe doniesienia wskazują na to, że ciała Cajala oraz nukleoplazma są miejscami akumulacji niedojrzałych form transkryptów tj. takich które posiadają niewycięte sekwencje intronowe. Prawdopodobnie to właśnie obecność „niewyciętych” sekwencji intronowych decyduje o retencji transkryptów i ich akumulacji na terenie ciał Cajala. Dokładny mechanizm odpowiedzialny za skierowywanie pre-mRNA do CB nie został na chwilę obecną poznany. Wykazano jednak, że transkrypty posiadające retencyjne introny podlegają ostatecznie dalszym etapom dojrzewania, w wyniku czego powstają funkcjonalne mRNA eksportowane na teren cytoplazmy.

2. CEL PRACY

Regulacja ekspresji genów w komórkach eukariotycznych jest procesem wieloetapowym i wielopoziomowym. Intuicyjnie mogłoby się wydawać, że decyzja o inicjacji transkrypcji genu powinna skutkować syntezą odpowiadającego mu białka w możliwie najkrótszym czasie. Jednakże obserwacja istnienia licznych mechanizmów post-transkrypcyjnej kontroli ekspresji genów wskazuje, że każdy etap na drodze od genu do białka podlega ścisłej regulacji. Pozwala to komórce precyzyjnie dostosować moment, ilość i miejsce syntezy białka do aktualnych potrzeb fizjologicznych.

Jednym z intensywnie badanych w ostatnich latach mechanizmów jest jądrowa retencja mRNA. Pomimo szerokiego poznania tego zjawiska w komórkach zwierzęcych, jego rola u roślin wciąż pozostaje słabo scharakteryzowana. Wstępne obserwacje mikroskopowe przeprowadzone przez nasz zespół w mikrosporocytach modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) ujawniły – obok wcześniej opisanej pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej – zjawisko globalnej retencji poli(A)RNA. Co istotne, proces ten jest powiązany z ciałami Cajala (*ang.* *Cajal bodies*, CB), co stanowi pierwszy opis zaangażowania tych domen w jądrową retencję RNA u roślin. Ponadto, wstępne analizy bioinformatyczne sugerują, że transkrypty gromadzone w CB często charakteryzują się obecnością jednej lub więcej niewyciętych sekwencji intronowych, co wskazuje na retencję intronów jako potencjalny kluczowy mechanizm leżący u podstaw zaobserwowanego zjawiska.

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie transkryptów charakteryzujących się retencją intronów oraz zbadanie składu molekularnego ciał Cajala na poszczególnych etapach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Wysłano hipotezę, że CB stanowią kluczowy przedział jądrowy bezpośrednio zaangażowany w mechanizm obserwowanej globalnej retencji poli(A)RNA. W celu realizacji postawionych celów, zaplanowano następujące zadania badawcze:

1. Przeprowadzenie kompleksowej analizy transkryptomu mikrosporocytów *Larix decidua* Mill. w celu identyfikacji transkryptów wykazujących retencję intronów

oraz opracowanie dedykowanej bazy danych gromadzącej szczegółowe informacje o zidentyfikowanych transkryptach.

2. Weryfikacja oraz walidacja wyników analizy bioinformatycznej za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w celu potwierdzenia obecności i określenia przestrzennej lokalizacji wyselekcjonowanych transkryptów.
3. Analiza dynamiki składu molekularnego ciał Cajala zaangażowanych w retencję intronów, przeprowadzona z wykorzystaniem immunofluorescencji, na poszczególnych etapach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.

3. MATERIAŁY

3.1 Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły mikrosporocyty modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) podczas diplotenu profazy I podziału meiotycznego. Gatunek ten charakteryzuje się niezwykle długim przebiegiem mejozy, trwającym około sześciu miesięcy, z profazą I rozpoczynającą się w październiku i kończącą na przełomie lutego i marca. W warunkach naturalnych mikrosporocyty wykazują wysoki stopień synchronizacji rozwojowej, co umożliwia uzyskanie dużej i jednorodnej populacji komórek w różnych fazach mejozy. Ułatwia to znacząco badanie procesów zachodzących w tych komórkach. Mikrosporocyty modrzewia mają stosunkowo cienkie ściany komórkowe, co ułatwia pozyskanie protoplastów do badań *in situ*. Charakteryzują się również dużym rozmiarem (około 70 μm), co pozwala na dokładną obserwację mikroskopową poszczególnych subkompartymentów komórkowych oraz mikrodomen jądrowych i cytoplazmatycznych.

Badania prowadzone w Katedrze Biologii Komórkowej i Molekularnej UMK wykazały, że mikrosporocyty modrzewia wyróżniają się naturalnymi fluktuacjami metabolizmu dotyczącymi m.in. aktywności transkrypcyjnej (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015), poziomu syntezy rRNA (Smoliński i wsp. 2007), oraz przestrzennej lokalizacji elementów maszyneryi splicingowej (Smoliński i wsp. 2011). Co więcej, w komórkach tych w sposób naturalny dochodzi do następujących po sobie cykli formowania i zanikania struktur zaangażowanych w metabolizm RNA, takich jak jądrowe ciała Cajala, oraz cytoplazmatyczne ciała bogate w U snRNP (Smoliński i wsp. 2011; Hyjek i wsp. 2015).

Dzięki tym cechom mikrosporocyty *Larix decidua* stanowią doskonały model badawczy, pozwalający na obserwację poszczególnych etapów metabolizmu rybonukleoprotein oraz białek w warunkach fizjologicznych, nie indukowanych przez eksperymentatora.

3.2 Oligonukleotydy

Oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed. W poniższej tabeli przedstawiono sekwencje wszystkich primerów oraz sond oligonukleotydowych wykorzystanych w przeprowadzonych analizach.

Nazwa	Sekwencja (5'→3')	Znakowanie na końcu 5'
qPCR – primery		
F_ RS2Z32 intron4	TAATATTTGTGGGCTTTAGGCGTG	-
R_ RS2Z32 intron4	TACGACTTCTGCTGTTGTAACCTTGC	-
F_ RS2Z32 Eg4-Eg5	AAATCAACCGGTCGTGAGC	-
R_ RS2Z32 Eg4-Eg5	CCTGGGAGTGTTCGTTTCG	-
F_ THOC4 intron 3	GAGGTCAACAGCTTAGGGTCAA	-
R_ THOC4 intron 3	CACCATCGCTATTTCTTTGTCTCTT	-
F_ THOC4 Eg3-Eg4	CTATCACCAAGTCGTTTCAGC	-
R_ THOC4 Eg3-Eg4	GTCCTCCTTCCTCTTCCATC	-
F_ RBM39 intron 1	GATAGGTCCAGAAGAGGAACTTCACA	-
R_ RBM39 intron 1	CAGTCTTTCCCGATCTTTATCTCTCC	-
F_ RBM39 Eg1-Eg2	CAGGCTAGGTGATACGTTG	-
R_ RBM39 Eg1-Eg2	CAGTCTTTCCCGCTCTTTATCTC	-
F_ hnRNP Q-like intron 7	AGATGGGCGTGTTGGATATGTATT	-
R_ hnRNP Q-like intron 7	GTTGTTGCCTGATCAACAAAGAGA	-
F_ hnRNP Q-like Eg7-Eg8	GGGAGTCTTGGATATGTATTGCAAC	-
R_ hnRNP Q-like Eg7-Eg8	CCACCATGACTACTACTGCC	-
Hybrydyzacja <i>in situ</i> – sondy		
poli(A)RNA	T(T) ₄₁	Cy3
poli(A)RNA	T(T) ₄₁	Atto 488

U2 snRNA	ATATTAACTGATAAGAACAGATACTACACTTG	Cy5
eF1a mRNA	TGGTGACCTTTGCACCAGTGGGATCCTTCT	DIG
SERRATE mRNA	GTTCCATAGTAATCCAATCCATGAACTCGCCA	DIG
ACT mRNA	TCTTCTGGAGCAACTCGAAGCTCATTGTAGA	DIG
SDH mRNA	ACTTGTTCTGCTCTTTCATAGACCTCCCCACCAAT	DIG
RPB10 Eg2-Eg3 mRNA	CACTCCTCTCTAAAGTGTTGTAATTCAAAA	DIG
RPB10 intron2 mRNA	AAAAGCAAAGATAAGACGATTGATG3	DIG
SmG intron 1 mRNA	<u>Start20</u> TTCATAAATAAGTTCATCTTAACCGAACTA <u>Start 68</u> ATTACAGAAACCATCCACTATGTACT <u>Start 112</u> ATTTCTTATTCTTATACCAGTGAAATGTGA	DIG
SmD1 intron 1 mRNA	GAAAAACATATCTAAGTTCAAGAAAT	DIG
SmD1 intron 2 mRNA	ATTCTTTGAACTTGCACTACTTTGTAGAG	DIG
SmD2 intron 3 mRNA	AGAAAGGTTAAAATATGCTGAATGGAGTAT	DIG
hnRNP Q-like intron7 mRNA	AACAAAGAGAAATAAATTTCAAGAAACAG	DIG
hnRNP Q-like mRNA Eg4-Eg5	TCCCTGGTTGTTGCAATACATATCCAAC	DIG
RS2Z32 mRNA intron 4	CTAAAGCCCACAAATATTAATTGTTTTTAA	DIG
RS2Z32 mRNA Eg4-Eg5	CCAAAATCAACCGGGCGTGAGCGGTCTGC	DIG
THOC4 intron 3 mRNA	CGTTCCTTTATCTTTTATATCCATCCTAGTA	DIG
THOC4 Eg3-Eg4 mRNA	CCCTTGTTACGGCTGAACGACTTGCGGATAGTAT ATGGC	DIG
RBM39 intron 1 mRNA	CTCTATCACTCCTGTCTCTTGTTTCTT	DIG
RBM39 Eg1-Eg2 mRNA	CCTATCATGCTCTCCCCCTTGCCCTTTTGGACCG G	DIG

3.3 Przeciwciała

Poniższa tabela zawiera informacje dotyczące przeciwciał pierwotnych oraz wtórnych zastosowanych w procedurach immunoznakowania oraz detekcji pośredniej sond znakowanych digoksygeniną (DIG).

Nazwa	Klonal- ność	Pochodzenie	Rozpoznawany antygen	Firma	Znako- wanie
Przeciwciała pierwotne					
anty-DIG	MK**	królicze	DIG	Thermo Fisher Scientific	-
anty-TMG	MK**	mysie	czapeczka m3G	Santa Cruz Biotechnology	-
anty-TGS-1	PK**	królicze	TGS-1 (syntaza trimetyloguanozyny)	Sigma-Aldrich	-
ANA No.5	PK**	ludzkie	Sm	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta GA 30333, USA	-
1C7	MK**	szczurze	niefosforylowana domena CTD polimerazy II RNA	Chromotek	-
3E10	MK**	szczurze	fosforylowana Ser 2 w domenie CTD polimerazy II RNA	Chromotek	-
4E12	MK**	szczurze	fosforylowana Ser 7 w domenie CTD polimerazy II RNA	Chromotek	-
anty-SE	PK**	królicze	SERRATE	Agrisera	-

anty-koilina	PK**	Królicze	domena tudor białka koiliny	Davids Biotechnologie	-
Przeciwciała wtórne					
anty-mysie	PK**	Koźle	mysie IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488
anty-królicze	PK**	Koźle	królicze IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488
anty-królicze	PK**	Koźle	królicze IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 647
anty-szczurze	PK**	koźle	szczurze IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488
anty-ludzkie	PK**	koźle	ludzkie IgG	Thermo Fisher Scientific	Alexa 488
anty-królicze	PK**	koźle	królicze IgG	Sigma-Aldrich	POD*
anty-mysie	PK**	koźle	mysie IgG	Sigma-Aldrich	POD*
anty-królicze	PK**	koźle	królicze IgG	Abberior	STAR red
anty-mysie	PK**	koźle	mysie IgG	Abberior	STAR Orange

*przeciwciało sprzężone z peroksydazą (POD)

**MK - monoklonalne PK – poliklonalne

3.4 Odczynniki

Nazwa	Firma
acetylowana BSA (acBSA)	Aurion
albumina wołowa (BSA)	Sigma-Aldrich
alkohol etylowy	POCH S.A.
alkohol izopropylowy	POCH S.A.
BLUeye Prestained Protein Ladder	Sigma-Aldrich
celulaza Onozuka R10	Serva
chlorek potasu (KCl)	POCH S.A.
chlorek wapnia (NaCl)	POCH S.A.
chloroform	POCH S.A.
ciekły azot	Air products
cytrynian trójsodowy ($C_6H_5Na_3O_7$)	POCH S.A.
diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	POCH S.A.
ditiotetriol (DTT)	Fluka
EDTA	Sigma-Aldrich
fenol:chloroform	Sigma-Aldrich
formamid	Sigma-Aldrich
glicyna	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	Life Technologies
kwasy cytrynianowy ($C_6H_8O_7$)	POCH S.A.
nadsiarczan amonu (APS)	Sigma-Aldrich
paraformaldehyd 16%	Polisciencences
pektynaza	Sigma-Aldrich
Pipes	Sigma-Aldrich
ProLong Gold	Thermo Fisher Scientific
Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate	Sigma-Aldrich
SDS	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich

TrisHCl	Sigma-Aldrich
TRIzol Reagent	Sigma-Aldrich
Twin 20	Sigma-Aldrich
wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4)	POCH S.A.

Enzymy i inhibitory

LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme	Thermo Fisher Scientific
Inhibitor proteaz ProBlock™ Gold Plant Protease	Roche
Inhibitor Cocktail (100x)	
EDTA-free	

Zestawy odczynników

BlueStain Sensitive Plus	EURx
kit BIO-RAD TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 12%	BIO-RAD
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham
BlueStain Sensitive Plus	EURx
Pierce Bradford Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
RNA 6000 Pico Kit	Agilent
High Sensitivity DNA Kit	Agilent
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq	Thermo Fisher Scientific
NEBNeg [®] Ultra™ II RNA Library Prep with Sample	New England BioLabs
Purification Beads	

3.5 Roztwory, bufory i mieszaniny

Utrwalacz (PFA 4%) pH= 7,4 :

- paraformaldehyd 16% 10 ml
- PIPES 20 ml
- woda bidestylowana 10 ml

Mieszanina enzymatyczna (protoplasty):

- celulaza 0,04 g
- pektynaza 60 μ l
- 10x bufor cytrynianowy 200 μ l
- woda bidestylowana 1740 μ l

1x bufor PBS (500 ml)

- NaCl 4 g
- KCl 0,1 g
- Na₂HPO₄ 0,72 g
- KH₂PO₄ 0,12 g
- woda bidestylowana do 500 ml

Bufor autoklawowano (121 °C, 1 atm., 20 minut) i ustalano pH = 7,2.

Bufor fosforanowy 0,5 M (100 ml, pH 7,0)

- Na₂HPO₄ 7,1 g
- NaH₂PO₄ 7,2
- woda bidestylowana do 100 ml

10x Bufor cytrynianowy (500 ml)

- bufor A – kwas cytrynianowy (4,2 g/200 ml H₂O)
- bufor B – cytrynian trójsodowy (8,5 g/300 ml H₂O)

Roztwory mieszano, a następnie ustalano pH = 4,8.

Bufor hybrydyzacyjny (5 ml)

- formamid 1750 μ l
- SSC 20x - 1000 μ l
- 100x mieszanina Denhardt'a
(1% Ficoll 400, 1% PVP, 1% BSA) 250 μ l
- EDTA 0,5 M 10 μ l
- bufor fosforanowy 0,5 M 500 μ l
- woda bidestylowana 1500 μ l

20x SSC (200 ml)

- NaCl 35,06 g
- cytrynian trójsodowy 17,64 g
- woda bidestylowana do 200 ml

Roztwór mieszano, a następnie ustalano pH = 7,0.

Bufor do izolacji białek Tris-EDTA:

- 25mM Tris-HCL
- 2mM EDTA
- 1%inhibitory proteaz

Bufor 2x Laemmli z DTT:

- 2x buforu Laemmli 450 μ l
- 1M DTT 50 μ l

10x bufor do elektroforezy :

- Tris 30g
- glicyna 144g
- SDS 10 g

1x bufor do elektroforezy :

- 10x bufor do elektroforezy 100 ml
- woda bidestylowana 900 ml

10x bufor do transferu (TB):

- Tris 30g
- glicyna 144g

1x TB :

- 10x bufor do transferu 100 ml
- etanol 100 ml
- woda bidestylowana 800 ml

10x bufor TBS :

- Tris 24 g
- NaCl 88 g
- woda bidestylowana 900 ml

Roztwór mieszano, a następnie uzupełniono wodą bidestylowaną do uzyskania końcowej objętości 1l i ustalano pH = 7,6.

1x bufor TBST:

- Tween 20 1ml
- 10x buforu TBS 100 ml
- Wody 900 ml

1% Roztwór blokujący:

- 1x bufor TBST 50 ml
- odtłuszczone mleko 0,5

4. METODY

4.1. Analizy mikroskopowe

4.1.1 Przygotowanie materiału do obserwacji mikroskopowych

Izolacja protoplastów do mikroskopii

Kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. zbierano w odstępach tygodniowych, od listopada do końca lutego, w pięciu kolejnych sezonach wegetacyjnych (lata 2020 – 2025). Okres ten odpowiada kolejnym stadium diplotenu profazy I podziału mejotycznego.

Po usunięciu łusek okrywających, świeżo zebrane kwiatostany (około 25-30 sztuk) utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA) w 0,1 M buforze PIPES o pH 7,2 przez 24 h. W celu wyeliminowania powietrza znajdującego się w materiale roślinnym, przez pierwszą godzinę utrwalanie prowadzono na lodzie w inkubatorze próżniowym (0,1 MPa), a następnie przez 23 h w temperaturze 4°C. Utrwalony materiał płukano w trzech zmianach buforu 1x PBS pH 7,2 (3 x 10 min) oraz trzykrotnie w 0,01 M buforze cytrynianowym pH 4,8 (3 x 5 min). Następnie mikrosporocyty izolowano poprzez mechaniczne rozgniatanie pylników szklaną bagietką na szkiełku zegarkowym w 0,01 M buforze cytrynianowym pH 4,8. W celu usunięcia ściany komórkowej, pozyskaną zawiesinę komórkową poddawano trawieniu enzymatycznemu w mieszaninie: 4% celulaza Onozuka R10 i 27 U/ml pektynaza w 0,01 M buforze cytrynianowym pH 4,8. Inkubację prowadzono przez 12,5 min w temperaturze 37°C, przy ciągłym mieszaniu (70 rpm). Po trawieniu materiał płukano trzykrotnie w 0,01 M buforze cytrynianowym pH 4,8 (3 x 3 min) oraz trzykrotnie w 1x PBS (3 x 3 min). Następnie protoplasty zawieszano w PBS i nakładano na uprzednio zmrożonych (-80°C) żelatynowanych szkiełkach podstawowych i pozostawiano do wyschnięcia.

4.1.2 Badanie synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów oraz czasu trwania pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

Badanie synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów w pojedynczym pąku oraz w obrębie jednej gałęzi

Pierwszym etapem badania synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów modrzewia w obrębie pojedynczego pąka kwiatowego było przygotowanie protoplastów zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (rozdz. 4.1.1). W tym wariantcie do przygotowania dwóch preparatów użyto jednego pąka. Eksperyment przeprowadzono w pięciu powtórzeniach technicznych. Komórki zawieszono w 80 μ L buforu 1x PBS, a całą objętość podzielono równomiernie między dwa szkiełka podstawowe (po 40 μ L na każde).

W przypadku analizy synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów izolowanych z pąków pobranych z jednej gałęzi, również zastosowano procedurę przygotowania protoplastów zgodnie z opisem w rozdziale 4.1.1. Komórki pozyskano z dziesięciu różnych pąków kwiatowych pochodzących z tej samej gałęzi. Również w tym przypadku wykonano pięć powtórzeń technicznych. Ostatecznie komórki zawieszono w 40 μ L buforu 1x PBS, a całą zawiesinę naniesiono na jedno szkiełko podstawowe.

W obu wariantach eksperymentu na przygotowanych protoplastach przeprowadzono podwójne znakowanie z wykorzystaniem sond: jednej komplementarnej do ogonów poliadenylowanych, oraz drugiej – do sekwencji wewnętrznej U2 snRNA. Reakcję hybrydyzacji wykonano zgodnie z procedurą opisaną poniżej.

1. Przed przystąpieniem do wykonania reakcji, protoplasty permeabilizowano w 0,1% roztworze Triton X-100 w 1x PBS pH 7,2 przez 10 min, a następnie płukano w 1x PBS pH 7,2 (3 x 3 min)
2. Inkubacja z bezpośrednio znakowanymi sondami; oligo(dT) znakowaną Cy3 oraz U2 snRNA znakowaną Cy5, obie w stosunku 1:300 w buforze hybrydyzacyjnym.

Preparaty inkubowano przez 24h w temperaturze 27°C w wilgotnej komorze z 30% formamidem

3. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (5 x 1 min)
- 2 x SSC (5 x 1 min)
- 1 x SSC (1 x 15 min)

4. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (1 x 3 min)

5. Zamknięcie preparatów przy pomocy medium przedłużającego efekt fluorescencji - ProLong Gold z Hoechst w stosunku 1:10 000

6. Dla utwardzenia medium preparaty pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie preparaty przechowywano w 4°C.

Analizę przygotowanych preparatów przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica SP8, dostępnego w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Zbieranie danych polegało na zliczaniu komórek znajdujących się na różnych etapach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. W celu zapewnienia rzetelności wyników, wykluczono możliwość wielokrotnego zliczenia tych samych komórek poprzez ich systematyczne oznaczanie na mapie preparatu.

Badanie czasu trwania pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

W celu oceny czasu trwania pełnego cyklu poli(A)RNA oraz poszczególnych jego stadiów, materiał biologiczny zbierano codziennie przez okres 20 dni. Każdego dnia pobierano po jednym pąku kwiatowym z tej samej gałęzi. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych, wykorzystując pąki pochodzące z trzech różnych drzew rosnących w bezpośrednim sąsiedztwie. Z pobranych pąków codziennie izolowano mikrosporocyty i przygotowywano z nich protoplasty, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.1.1.

Po zakończeniu 20-dniowego okresu zbierania materiału, na przygotowanych protoplastach wykonano podwójne znakowanie. Reakcję hybrydyzacji przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną procedurą, analogicznie do tej zastosowanej w badaniu synchroniczności rozwojowej.

4.1.3 Lokalizacja RNA i białek

Przed przystąpieniem do wykonania reakcji, protoplasty permeabilizowano w 0,1% roztworze Triton X-100 w 1x PBS pH 7,2 przez 10 min, a następnie płukano w 1x PBS pH 7,2 (3 x 3 min).

Kontrole specyficzności wszystkich reakcji przeprowadzono zgodnie z opisanymi poniżej protokołami, z pominięciem etapu: inkubacji z przeciwciałem pierwotnym (zamiast tego prowadzono inkubację w 0,01% acBSA w buforze 1x PBS, pH 7,2), inkubacji z przeciwciałem wtórnym (zamiast tego prowadzono inkubację w 0,01% acBSA w buforze 1x PBS, pH 7,2) lub z pominięciem sondy oligonukleotydowej (inkubacja wyłącznie w buforze hybrydyzacyjnym). Wszystkie reakcje, z wyjątkiem jednej, dały wynik negatywny (Supl.29; Supl.30). Pozytywny wynik reakcji uzyskano wyłącznie w przypadku zastosowania króliczego przeciwciała pierwotne anty-DIG. (Supl.30).

Lokalizacja pre-mRNA/mRNA, poli(A) RNA oraz U2 snRNA

Reakcje wykonywano zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z sondą oligonukleotydową znakowaną digoksygeniną komplementarną do wybranego pre-mRNA lub mRNA, w stosunku 1:100 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze z 30% formamidem w temperaturze 27°C przez 4h.
2. Po upływie 4h dodano dwie sondy; oligo(dT) z Cy3 oraz U2 snRNA z Cy5, obie w stosunku 1:300 w buforze hybrydyzacyjnym i inkubowano w tych samych warunkach przez noc.

3. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (5 x 1 min)
- 2 x SSC (5 x 1 min)
- 1 x SSC (1 x 15 min).

4. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (1 x 3 min).

5. Inkubacja z króliczym przeciwciałem pierwotnym anti-DIG, w stosunku 1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze 11°C.

6. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5x 3 min).

7. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anti-króliczym sprzężonym z Alexa488, w stosunku 1:1000 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1,5h w temperaturze 33°C.

8. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5x 3 min) oraz dokładne osuszenie preparatów.

9. Zamknięcie preparatów przy pomocy medium przedłużającego efekt fluorescencji - ProLong Gold z Hoechst w stosunku 1:10 000.

10. Dla utwardzenia medium preparaty pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie preparaty przechowywano w 4°C.

Lokalizacja białek, poli(A)RNA oraz U2 snRNA

Reakcje przeprowadzono zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z sondami: oligo(dT) z Cy3 oraz U2 snRNA z Cy5, obie w stosunku 1:300 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze z 30% formamidem w temperaturze 27°C przez 24h.

2. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (5 x 1 min)
- 2 x SSC (5 x 1 min)

- 1 x SSC (1 x 15 min).
3. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (1 x 3 min).
 4. Inkubacja z przeciwciałem pierwotnym, w wilgotnej komorze, przez całą noc w temperaturze 11°C. Poniżej wymieniono wykorzystywane przeciwciała:
 - ludzkie anti-Sm ANA No. 5 (poprzedzone pre-inkubacją z 2% BSA w 1x PBS pH 7,2 przez 15 min w temperaturze pokojowej, przeciwciało w stosunku 1:200 w 0,2% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - mysie anti-m3G (1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - królicze anti-TGS-1 (1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - szczurze 1C7 (1:100 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - szczurze 3E10 (1:100 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - szczurze 3E8 (1:100 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - szczurze 4E12 (1:100 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - królicze anti-SE (1:250 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - królicze anti-koilina (1:87 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2).
 5. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min).
 6. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym, w wilgotnej komorze, przez 1,5h w temperaturze 33°C:
 - anti-ludzkie z Alexa 488 (1:750 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - anti-mysie z Alexa 488 (1:1000 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - anti-królicze z Alexa 488 (1: 1000 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2)
 - anti-szczurze z Alexa 488 (1: 300 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2).
 7. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min) oraz dokładne osuszenie preparatów.
 8. Zamknięcie preparatów przy pomocy medium przedłużającego efekt fluorescencji - ProLong Gold z Hoechst w stosunku 1:10 000.
 9. Dla utwardzenia medium preparaty pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie preparaty przechowywano w 4°C.

Jednoczesna lokalizacja dwóch różnych białek oraz poli(A)RNA

Reakcje przeprowadzono zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z przeciwciałem pierwotnym, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze 11°C:
 - mysim anti-TMG (1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2).
2. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min).
3. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym, w wilgotnej komorze, przez 1,5h w temperaturze 33°C:
 - anti-mysim sprzężonym ze STAR orange (1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2).
4. Inkubacja z przeciwciałem pierwotnym, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze 11°C:
 - króliczym anti-TGS-1 (1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2).
5. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min).
6. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym, w wilgotnej komorze, przez 1,5h w temperaturze 33°C:
 - anti-króliczym sprzężonym ze STAR red (1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2).
7. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min).
8. Inkubacja z sondą: oligo(dT) znakowaną ATTO488 w stosunku 1:300 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze z 30% formamidem w temperaturze 27°C przez 24h.
9. Płukanie w wodnych roztworach SSC:
 - 4 x SSC (5 x 1 min)
 - 2 x SSC (5 x 1 min)
 - 1 x SSC (1 x 15 min).

10. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (1 x 3 min) oraz dokładne osuszenie preparatów.
11. Zamknięcie preparatów przy pomocy medium przedłużającego efekt fluorescencji - ProLong Gold z Hoechst w stosunku 1:10 000.
12. Dla utwardzenia medium preparaty pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie preparaty przechowywano w 4°C.

Jednoczesna lokalizacja dwóch różnych pre-mRNA, poli(A)RNA oraz U2 snRNA

Reakcje wykonywano zgodnie z protokołem:

1. Inkubacja z sondą oligonukleotydową znakowaną DIG, w stosunku 1:100 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze z 30% formamidem w temperaturze 27°C przez 24h. Wykonano 5 preparatów, które inkubowano z następującymi sondami znakowanymi DIG:

- Preparat 1 – trzy sondy do sekwencji intronu 1 w pre-mRNA kodującym białko SmG
- Preparat 2 – trzy sondy do sekwencji intronu 1 w pre-mRNA kodującym białko SmG
- Preparat 3 – trzy sondy do sekwencji intronu 1 w pre-mRNA kodującym białko SmG
- Preparat 4 – sonda do sekwencji intronu 1 w pre-mRNA kodującym białko SmD1
- Preparat 5 – sonda do sekwencji intronu 2 w pre-mRNA kodującym białko SmD1.

2. Płukanie w wodnych roztworach SSC:

- 4 x SSC (4 x 1 min)
- 2 x SSC (4 x 1 min)
- 1 x SSC (1 x 10 min).

3. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (1 x 3 min).

4. Inkubacja z króliczym przeciwciałem pierwotnym anti-DIG, w stosunku 1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze 11°C.
5. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min).
6. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anti-króliczym znakowanym Alexa488, w stosunku 1:1000 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1,5h w temperaturze 33°C.
7. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (3 x 3 min).
8. Inkubacja z sondą oligonukleotydową znakowaną DIG, w stosunku 1:100 w buforze hybrydyzacyjnym, w wilgotnej komorze z 30% formamidem w temperaturze 27°C przez 24h. Preparaty inkubowano z następującymi sondami znakowanymi DIG:
 - Preparat 1 – sonda do sekwencji intronu 1 w pre-mRNA kodującym białko Smd1
 - Preparat 2 – sonda do sekwencji intronu 2 w pre-mRNA kodującym białko Smd1
 - Preparat 3 – sonda do sekwencji intronu 3 w pre-mRNA kodującym białko Smd2
 - Preparat 4 – sonda do sekwencji intronu 3 w pre-mRNA kodującym białko Smd2
 - Preparat 5 – sonda do sekwencji intronu 3 w pre-mRNA kodującym białko Smd2.
9. Dodanie sondy oligo(dT) z Cy3 w stosunku 1:300 w buforze hybrydyzacyjnym i inkubowanie w tych samych warunkach przez 4h.
10. Płukanie w wodnych roztworach SSC:
 - 4 x SSC (4 x 1 min)
 - x SSC (4 x 1 min)
 - 1 x SSC (1 x 10 min).
11. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (1 x 3 min).
12. Inkubacja z króliczym przeciwciałem pierwotnym anti-DIG, w stosunku 1:200 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez noc w temperaturze 11°C.
13. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min).

14. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anty-króliczym znakowanym Alexa 647, w stosunku 1:100 w 0,01% acBSA w 1x PBS pH 7,2, w wilgotnej komorze, przez 1,5h w temperaturze 33°C.
15. Płukanie w 1x PBS pH 7,2 (5 x 3 min) oraz dokładne osuszenie preparatów.
16. Zamknięcie preparatów przy pomocy medium przedłużającego efekt fluorescencji - ProLong Gold z Hoechst w stosunku 1:10 000.
17. Dla utwardzenia medium preparaty pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie preparaty przechowywano w 4°C.

4.1.4 Mikroskopia

Mikroskopia konfokalna

Obrazy uzyskano przy użyciu mikroskopów konfokalnych Leica TCS SP8 oraz Olympus FV3000. Do akwizycji wykorzystano zoptymalizowany otwór aperturowy, długi czas ekspozycji (400 Hz) oraz immersyjny obiektyw olejowy Plan Achromat DIC H o powiększeniu 63x i aperturze numerycznej 1,4. Rejestracji obrazów dokonywano sekwencyjnie w kanałach: niebieskim (Hoechst 33342), zielonym (Alexa Fluor 488) czerwonym (Cy3) oraz dalekiej czerwieni (Alexa Fluor 647, Cy5). W celu zminimalizowania efektu przenikania sygnałów między kanałami stosowano niską moc laserów oraz tryb sekwencyjnego zbierania sygnału dla każdego kanału oddzielnie. Cięcia optyczne wykonywano w odstępach co 1,01 μm . Rejestrację i analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania LAS AF oraz OlyVIA.

Mikroskopia wysokorozdzielcza – STED

Obserwacje w mikroskopii wysokorozdzielczej (STED) przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu superrozdzielczego Abberior Facility Line. Do detekcji sygnału zastosowano fluorochromy kompatybilne z techniką STED: STAR red, STAR orange oraz Atto488. Obrazy rejestrowano w trybie sekwencyjnym dla poszczególnych kanałów, z użyciem zoptymalizowanych parametrów ekscytacji oraz wygaszania sygnału STED. W celu uzyskania maksymalnej rozdzielczości przestrzennej zastosowano obiektyw immersyjny o wysokiej aperturze numerycznej. Wszystkie parametry akwizycji

dobierano indywidualnie dla każdego fluorochromu. Rejestracja i analiza obrazów prowadzona była za pomocą dedykowanego oprogramowania LightBox (Abberior Instruments).

Dla wszystkich antygenów i stadiów rozwojowych uzyskane dane zostały skorygowane o autofluorescencję tła, określoną na podstawie intensywności sygnałów kontrolnych negatywnych. Do przetwarzania i analizy obrazów użyto programu ImageJ oraz dla obrazów w wysokiej rozdzielczości programu Lightbox Viewer.

4.2 Badanie specyficzności wiązania antygeny przez przeciwciała anty-koilina

Produkcję przeciwciała anty-koilina powierzono firmie Davids Biotechnologie. Do jego wytworzenia wykorzystano fragment przewidywanej sekwencji aminokwasowej wysoce konserwowanej domeny Tudor białka koiliny u *Larix decidua* Mill. Wybór odpowiedniego fragmentu sekwencji aminokwasowej peptydu oparto na trzech głównych kryteriach:

- antygenowość – wykorzystano algorytmy bioinformatyczne do identyfikacji sekwencji o wysokim potencjale immunogennym, zdolnych do indukowania silnej odpowiedzi przeciwciał
- rozpuszczalność – analizowano przewidywaną dostępność sekwencji na powierzchni peptydu, co zwiększa szanse na jej rozpoznanie przez układ immunologiczny
- predykcja epitopów – zastosowano narzędzia obliczeniowe służące do identyfikacji sekwencji prawdopodobnie pełniących funkcję epitopów indukujących odpowiedź limfocytów B

Na podstawie tych kryteriów wybrano fragment charakteryzujący się najwyższym potencjałem immunogennym. Sekwencja wykorzystana do produkcji przeciwciała anty-koilina przedstawia się następująco:

- DIDFASLVDVRVWHQHK

Specyficzność wiązania antygeny przez otrzymane przeciwciała oceniono za pomocą analizy Western blot (WB).

4.2.1 Izolacja białek do analizy metodą Western blot

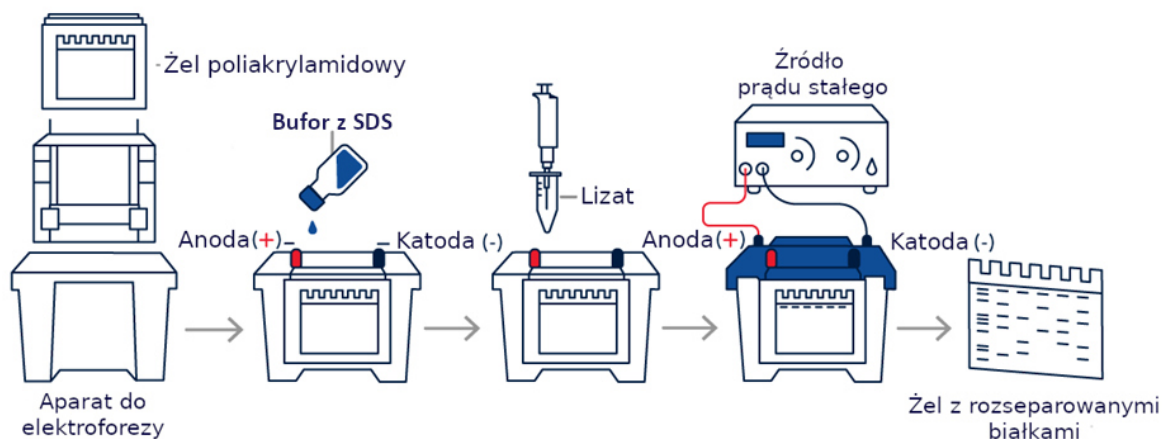
Świeżo zebrane kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C . W celu izolacji białek do analizy Western blot, 0,5g materiału roślinnego rozcierano w moździerzu w obecności ciekłego azotu, a następnie dodawano 1,5 ml buforu ekstrakcyjnego Tris-EDTA (25 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% mieszanina inhibitorów proteaz). Po dokładnym wymieszaniu próbki wirowano w wirówce wychylnej przy $16\,000\times g$ przez 30 minut w temperaturze 4°C . Uzyskany supernatant stanowił frakcję białkową komórek pylnika i był wykorzystywany do dalszych analiz.

4.2.2 Pomiar stężenia białek w próbce

Stężenie białek w uzyskanych próbkach określono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem zestawu Commassie Protein Assay, zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Pomiaru dokonano przy długości fali 596 nm. Stężenie białka w próbach obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej z wykorzystaniem surowicy wołowej albuminy (BSA).

4.2.3 Elektroforeza białek SDS-PAGE

Przed naniesieniem na żel, próby poddano denaturacji poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 5 minut na bloku grzejnym, a następnie krótko odwirowano. Elektroforezę przeprowadzono w 1mm żelu poliakrylamidowym o stężeniu 12% (żel rozdzielający), po uprzednim zatężeniu próbek w żelu zagęszczającym o stężeniu 5%. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy natężeniu prądu 25 mA (na jeden żel), w buforze Laemmego z dodatkiem DTT, do momentu migracji barwnika frontowego poza żel (Ryc.11).

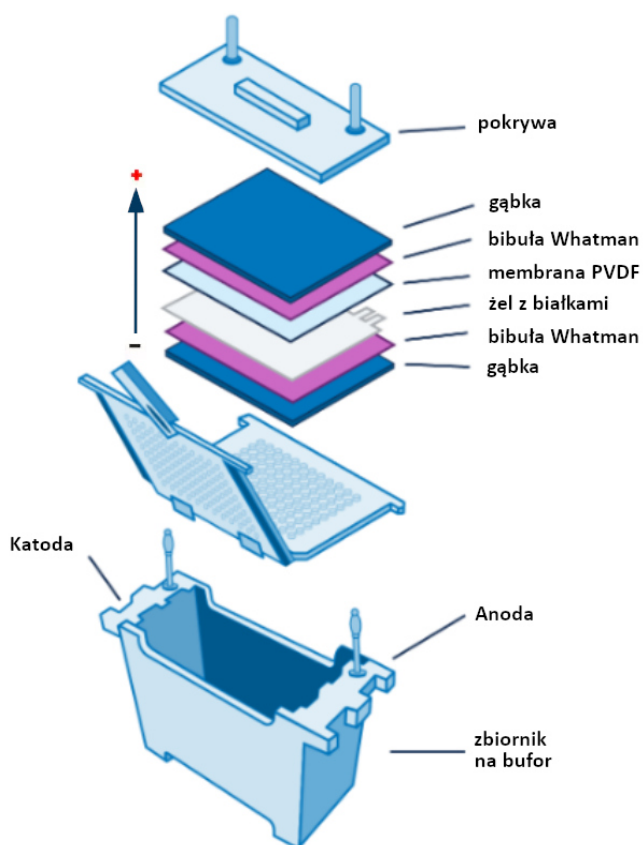


Ryc.11 Schemat przedstawiający kolejne etapy elektroforezy SDS-PAGE. Źródło: opracowanie własne na podstawie materiałów dostępnych na stronie Bio-Techne (<https://www.bio-techne.com/applications/western-blotting/western-blot-sds-page>).

4.2.4 Transfer białek z żelu na membranę PVDF

Transfer białek na membranę PVDF przeprowadzono według następującej procedury:

1. Po zakończeniu elektroforezy żel delikatnie wyjmowano z płytek, po czym odcinano żel zagęszczający.
2. Membranę PVDF (porowatość 0,45 μm) inkubowano przez 5 minut w buforze transferowym (1×TB).
3. Na gąbkę umieszczoną w kasie transferowej kolejno nakładano: bibułę Whatmana nasączoną buforem 1×TB, przygotowaną membranę, żel (usuwając ewentualne pęcherzyki powietrza między warstwami poprzez delikatne dociskanie), kolejną warstwę bibuły Whatmana oraz drugą gąbkę (Ryc.12).
4. Transfer białek przeprowadzono przy napięciu 100 V przez 1 godzinę, wykorzystując zasilacz wysokonapięciowy.



Ryc. 12 Schemat przedstawiający wszystkie warstwy oraz elementy aparatu stosowanego podczas transferu białek z żelu poliakrylamidowego na membranę PVDF. Źródło: opracowanie własne na podstawie materiałów dostępnych na stronie internetowej firmy LI-COR Biosciences (<https://www.licor.com/bio/blog/choosing-the-right-western-blot-transfer-method>).

4.2.5 Western blot

1. Po zakończeniu transferu białek, membranę blokowano w 1% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze TBST (0,1% Tween 20) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce laboratoryjnej.
2. Następnie membranę przepłukiwano w buforze TBST (1 × 15 min), po czym inkubowano z króliczym przeciwciałem pierwotnym anti-koilina (rozcieńczenie 1:1000 w 1% mleku odtłuszczonego) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, na kołysce laboratoryjnej.
3. Po inkubacji membranę płukano w buforze TBST (3 × 15 min), a następnie inkubowano z przeciwciałem wtórnym anti-króliczym sprzężonym z peroksydazą

chrzanową (rozcieńczenie 1:50 000 w 1% mleku) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, również na wytrząsarce.

4. Po końcowym płukaniu w buforze TBST (3×15 min), membranę osuszano i nakładano mieszaninę odczynników A i B z zestawu Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (zmieszane w stosunku 1:1), inkubując przez 5 minut.
5. Sygnał detekcji rejestrowano przy użyciu systemu BIO-RAD ChemiDoc MP, z wykorzystaniem oprogramowania Image Lab Touch.

4.3 Analizy kwasów nukleinowych

4.3.1 Izolacja RNA z mikrosporocytów *Larix decidua* Mill.

Wszystkie etapy izolacji RNA przeprowadzano w warunkach wolnych od RNaz. Używano odpowiednio przygotowanych roztworów, buforów, odczynników oraz materiałów laboratoryjnych (probówki, końcówki do pipet, filtry), które były wolne od enzymów degradujących RNA.

1. Kwiatostany męskie *Larix decidua* Mill. zbierano w odstępach tygodniowych – od listopada do końca lutego – przez cztery kolejne sezony wegetacyjne (2020–2024). Po usunięciu łusek okrywających, świeżo zebrane kwiatostany natychmiast rozcierano na szkiełku zegarkowym w schłodzonym buforze PBS z dodatkiem DEPC (pH 7,2), umieszczonym na lodzie, w celu uwolnienia mikrosporocytów z pylników.
2. W celu usunięcia pozostałości tkanek okrywających, uzyskaną zawiesinę przesączano przez sterylne sita komórkowe o odpowiednio dobranej średnicy porów (40 μm , 70 μm lub 100 μm – w zależności od stadium rozwojowego materiału), bezpośrednio do probówek typu Falcon.
3. Filtrat wirowano przez 1,5 minuty w temperaturze 4 °C, przy prędkości 8000 rpm.
4. Po całkowitym usunięciu supernatantu, osad komórkowy zawieszano dokładnie w 500 μL schłodzonego odczynnika TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific), celem dalszej izolacji RNA.
5. Próby homogenizowano przy użyciu ręcznego homogenizatora mechanicznego, po czym zamrażano je na 5 minut w temperaturze –80 °C.
6. Po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej próbki ponownie homogenizowano, a następnie wirowano przy 10 000 $\times$ g przez 10 minut w temperaturze 4 °C.
7. Otrzymany supernatant przenoszono do wcześniej przygotowanych probówek Phasemaker Tubes (przed użyciem probówki wirowano przez 30 s przy 16 000 $\times$ g) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej.

8. Do każdej próbki dodawano 0,1ml chloroformu na każde 500µl użytego odczynnika TRIzol, intensywnie mieszano przez 15 sekund na wytrząsarce typu vortex, a następnie inkubowano przez 2–3 minuty w temperaturze pokojowej.
9. Następnie próbki wirowano przez 5 minut przy 16 000×g w temperaturze 4°C. Po wirowaniu uzyskiwano trzy fazy: dolną (czerwoną, zawierającą fenol-chloroform), interfazę oraz górną (bezbarwną, wodną) zawierającą RNA. Wodną fazę (stanowiącą ok. 50% objętości użytego TRIzolu) ostrożnie przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf.
10. Do przeniesionego roztworu dodawano 0,25 ml izopropanolu na każde 500µl użytego TRIzolu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w celu wytrącenia RNA.
11. Następnie próbki wirowano przez 10 minut przy 12 000×g w temperaturze 4°C.
12. Po usunięciu supernatantu do osadu dodawano 500µl 75% etanolu (przygotowanego na DEPC-treated water) na każde 500µl użytego TRIzolu.
13. Próbkę mieszano na wytrząsarce typu vortex, po czym wirowano przez 5 minut przy 7 500×g w temperaturze 4°C.
14. Supernatant usuwano, a próbki pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej na 5–10 minut (do momentu całkowitego odparowania alkoholu, ale bez przesuszenia).
15. Osad RNA rozpuszczano w 20–50µl wody wolnej od RNaz i inkubowano w termobloku w temperaturze 55–60°C przez 10–15 minut.
16. Uzyskane RNA przechowywano w –80°C do czasu dalszych analiz.

4.3.2 Izolacja total RNA do analizy transkryptomów poszczególnych faz syntezy i eksportu poli(A)RNA

W celu uzyskania frakcji komórek znajdujących się w określonych stadiach cyklu poli(A)RNA, materiał biologiczny zbierano w odpowiednich odstępach czasu, zawsze z tej samej gałęzi. Kluczowym etapem było określenie stadium cyklu, w którym znajdowały się komórki w momencie pobrania – identyfikacji dokonywano na podstawie analiz *in situ*. Następnie izolację RNA z każdej próby prowadzono zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 4.3.1. Ze względu na długi okres trwania stadium 1,

do analizy wykorzystano aż trzy próby RNA izolowanego w tym czasie (próby 1, 2 oraz 3 - stadium 1). Pierwsza z nich reprezentowała komórki na wczesnym etapie stadium 1, druga – komórki w jego fazie środkowej, natomiast trzecia – komórki w późnym stadium 1. Niestety, izolacja wyłącznie homogennych frakcji komórek w kolejnych stadiach cyklu poli(A)RNA okazała się niemożliwa z uwagi na bardzo krótki czas ich trwania. Z tego względu zdecydowano się na izolację dwóch heterogennych frakcji: jedna (próba 4) obejmowała komórki znajdujące się w stadium 2 i 3, natomiast druga (próba 5) – komórki w stadium 4 i 5.

Część wyizolowanego w opisany sposób RNA całkowitego (total RNA) została wykorzystana bezpośrednio do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania. Pozostałą część materiału poddano procedurze izolacji mRNA, zgodnie z protokołem opisanym w kolejnym punkcie (rozdz. 4.3.3).

4.3.3 Izolacja mRNA z total RNA do analizy transkryptomów poszczególnych faz syntezy i eksportu poli(A)RNA

Do izolacji mRNA z poszczególnych prób RNA całkowitego (próby 1–5) wykorzystano zestaw Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Thermo Fisher Scientific). Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Główne etapy izolacji obejmowały:

- przygotowanie kulek magnetycznych Dynabeads® oligo(dT)₍₂₅₎ (płukanie)
- przygotowanie próbek RNA całkowitego
- przeprowadzenie dwóch rund izolacji mRNA, z których każda składała się z etapów: wiązania mRNA z kulkami magnetycznymi, płukania oraz eluowania mRNA

Wyizolowany w ten sposób matrycowy RNA (mRNA) został wykorzystany do dalszej syntezy bibliotek cDNA.

4.3.4 Odwrotna transkrypcja

W celu uzyskania komplementarnego DNA (cDNA) do analiz PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji (*ang. reverse transcription*, RT). Zastosowano SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme (Invitrogen) oraz startery losowe (*ang. random hexamers*), zgodnie z zaleceniami producenta.

Reakcję prowadzono według następującego protokołu:

- denaturacja RNA: 5 min, 65 °C
- inkubacja z mieszaniną reakcyjną: 10 min, temperatura pokojowa
- odwrotna transkrypcja: 10 min, 50 °C
- inaktywacja enzymu: 5 min, 85 °C

Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze –20 °C do momentu dalszych analiz.

4.3.5 PCR w czasie rzeczywistym (*ang. quantitative PCR*, qPCR)

Reakcję qPCR prowadzono w objętości 20 µl, w skład której wchodziło: 10 µl odczynnika 2× LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), 5 µl matrycy cDNA oraz 0,2 µl każdego ze specyficznych starterów (starter forward i reverse). Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem systemu LightCycler® 96 (Roche).

Reakcję prowadzono zgodnie z następującym profilem temperaturowym:

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	15s	40
Przyłączanie starterów	Ustalono gradienty temperaturowe w zależności od par primerów stosowanych w poszczególnych próbach : 50°C-54°C 51°C-55°C lub 55°C-58°C	30s	

Amplifikacja	72°C	30s	40
Denaturacja	Od 72°C do 97°C	1s na każdy 1°C	1

Specyficzność reakcji potwierdzono na podstawie obecności pojedynczego piku na krzywej topnienia. Wszystkie analizy prowadzono w trzech powtórzeniach technicznych. Dla każdej pary primerów przeprowadzano również reakcje kontrolne bez matrycy cDNA (*ang. no template control*, NTC).

Wybrane produkty reakcji qPCR poddano sekwencjonowaniu w celu dodatkowego potwierdzenia specyficzności działania zastosowanych w reakcji primerów. Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie Genomed S.A. (Warszawa).

4.3.6 Analiza ilościowa i jakościowa kwasów nukleinowych

Całkowite RNA, mRNA, produkty reakcji qPCR oraz biblioteki cDNA analizowano z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) oraz analizatora kapilarnego Bioanalyzer 2100 (Agilent). Do analizy jakości i ilości RNA zastosowano zestaw RNA 6000 Pico Kit (Agilent), natomiast do oceny bibliotek cDNA – High Sensitivity DNA Kit (Agilent), zgodnie z instrukcjami producenta. Dodatkowo, biblioteki cDNA poddawano analizie ilościowej metodą fluorymetryczną przy użyciu aparatu Qubit oraz zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit.

4.3.7 Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania

Synteza bibliotek cDNA do analizy transkryptomów poszczególnych faz syntezy i eksportu poli(A)RNA

Po analizie ilościowej i jakościowej, całkowite RNA poddano deplekcji rybosomalnego RNA przy użyciu zestawu RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq (Invitrogen), zgodnie z protokołem udostępnionym przez producenta. Otrzymane RNA ponownie oceniono pod względem jakości i ilości, a następnie wykorzystano jako matrycę do syntezy bibliotek cDNA przeznaczonych do sekwencjonowania.

Zarówno w przypadku RNA całkowitego, jak i mRNA, do przygotowania bibliotek wykorzystano komercyjny zestaw NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep with Sample Purification Beads (New England Biolabs). Wszystkie etapy przygotowania bibliotek

cDNA przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Procedura obejmowała kolejno: fragmentację RNA i dołączenie primerów, syntezę pierwszej, a następnie drugiej nici cDNA, oczyszczenie dwuniciowego cDNA przy użyciu kulek magnetycznych, przygotowanie końców bibliotek, ligację adapterów, oczyszczenie produktów ligacji przy użyciu kulek NEBNext®, wzbogacenie DNA z przyłączonymi adapterami za pomocą PCR oraz końcowe oczyszczenie produktów reakcji PCR.

Dla każdej z 30 prób RNA przygotowano osobną bibliotekę cDNA. W poniższej tabeli przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące każdej z przygotowanych prób:

Nr próbki*	Rodzaj próbki	Reprezentowane stadium cyklu poli(A)RNA
1a, 1b, 1c	total RNA	wczesne stadium 1
2a, 2b, 2c	total RNA	stadium 1
3a, 3b, 3c	total RNA	późne stadium 1
4a, 4b, 4c	total RNA	stadia 2 oraz 3
5a, 5b, 5c	total RNA	stadia 4 oraz 5
6a, 6b, 6c	mRNA	wczesne stadium 1
7a, 7b, 7c	mRNA	stadium 1
8a, 8b, 8c	mRNA	późne stadium 1
9a, 9b, 9c	mRNA	stadia 2 oraz 3
10a, 10b, 10c	mRNA	stadia 4 oraz 5

* litery a, b oraz c znajdujące się przy numerze danej próby odpowiadają kolejnym powtórzeniom technicznym

4.3.8 Sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna

Analiza ilościowa, jakościowa, sekwencjonowanie prób oraz wstępna analiza bioinformatyczna zostały wykonane przez firmę Genomed S.A. w Warszawie. Przygotowano dane pochodzące z sekwencjonowania nowej generacji dla 30 bibliotek cDNA. Sekwencjonowanie wykonano na sekwenatorze NovaSeq6000 (Illumina) w trybie PE 150 zasad. Podstawowa analiza bioinformatyczna polegała na przycinaniu i filtrowaniu jakościowym odczytów dla 30 próbek małych cDNA.

Pierwszym wykonanym etapem było przycięcie surowych odczytów, które zostało wykonane przy użyciu programu Cutadapt v3.0. Filtrowanie przeprowadzono przy zastosowaniu minimalnej długości odczytów m 15. Kolejno przeprowadzono kontrolę jakości odczytów przy użyciu programu FastQC (version 0.11.8), na podstawie której sporządzono raport podsumowujący stan próbek po wstępnej obróbce. Dodatkowo wykorzystano program MultiQC do stworzenia zbiorczego raportu dla wszystkich sekwencjonowanych próbek. Wyniki otrzymano w postaci listy transkryptów w formacie FASTA do dalszej analizy.

Dalsza analiza bioinformatyczna, w ramach współpracy, została przeprowadzona przez dr hab. Michała Szcześniaka z Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka, Szkoły Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Celem prac bioinformatycznych było mapowanie uzyskanych odczytów na genomy *Larix kaempferi* oraz *Larix sibirica*, a także wzajemne mapowanie odczytów pomiędzy próbkami pochodzącymi z różnych faz cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Zabieg ten umożliwił identyfikację sekwencji transkryptów zawierających introny, które czasowo pozostają niewycięte. Dzięki zastosowaniu opracowanych kryteriów pozwalających na zaklasyfikowanie sekwencji jako retencyjne introny, możliwe było ich wiarygodne wyodrębnienie. Na podstawie uzyskanych danych opracowano bazę zawierającą transkrypty z retencyjnymi intronami, obecne w komórkach na różnych etapach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Stanowiła ona cenne źródło informacji niezbędnych do zaplanowania kolejnych etapów badań.

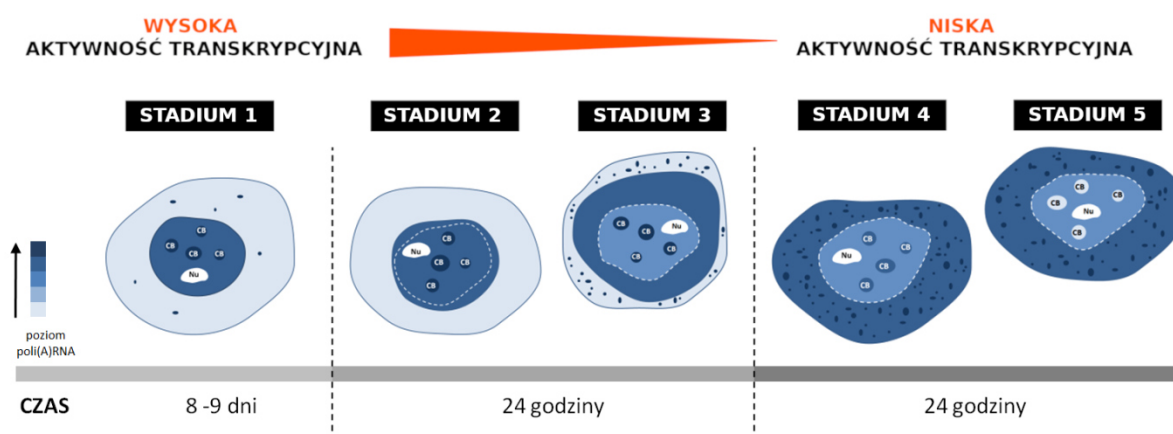
5. WYNIKI

5.1 Czas trwania poszczególnych stadiów cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

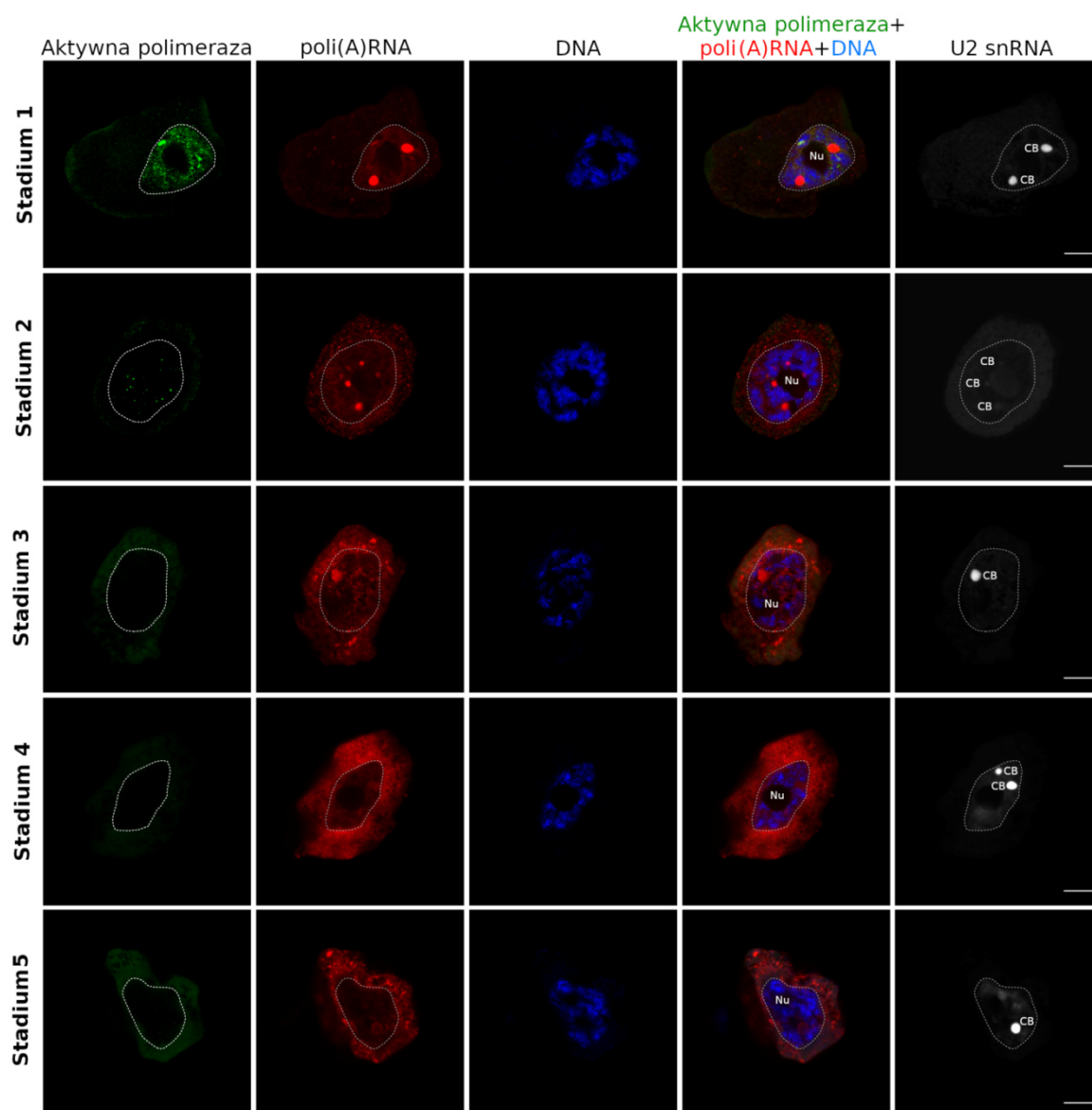
Jak przedstawiono we wstępie niniejszej pracy, wcześniejsze badania wykazały, że synteza mRNA w mikrosporocytach modrzewia przebiega w sposób pulsacyjny (Rudzka i wsp. 2022). Duża część mRNA pozostaje jednak w jądrze komórkowym na długo po syntezie i ulega wyraźnej akumulacji w ciałach Cajala. Następnie jest stopniowo transportowana do cytoplazmy, gdzie podlega translacji (Rudzka i wsp. 2022). Dotychczasowe analizy obejmowały pojedynczy cykl syntezy i eksportu poli(A)RNA, umożliwiając wyróżnienie kolejnych etapów tego procesu poprzez zmiany w poziomie i rozmieszczeniu poli(A)RNA w komórce (Rudzka i wsp. 2022). Dotychczasowe badania nie określały jednak precyzyjnych ram czasowych poszczególnych etapów cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA, dlatego podjęto próbę ich dokładnego ustalenia. W tym celu materiał pobierano codziennie z tej samej gałęzi, następnie izolowano protoplasty i przeprowadzano reakcję hybrydyzacji *in situ* dla poli(A)RNA, aby możliwa była identyfikacja konkretnego stadium. Zbadanie czasu trwania pojedynczego cyklu, możliwe było ze względu na występowanie wysokiej synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów w pąkach izolowanych z tej samej gałęzi (92,9%) (Supl.1; Supl.2) (Rudzka i wsp. 2022). Wyniki wykazały, że pojedynczy cykl syntezy i eksportu poli(A)RNA trwa od 10 do 11 dni. Najdłuższym etapem jest stadium 1, które trwa 8-9 dni. Należy tutaj podkreślić, że jest to moment wzmożonej syntezy poli(A)RNA oraz ich „zatrzymania” na terenie jądra komórkowego (Ryc.13).

Jednocześnie wykonano reakcje immunoznakowania ufosforylowanej seryny w pozycji 2 w powtórzonych heptapeptydach występujących w domenie CTD podjednostki RPB1 polimerazy RNA II, uważanej za aktywną formę enzymu. Wyniki tej reakcji potwierdziły, że wysoki poziom poli(A)RNA w stadium 1 koreluje z intensywnym sygnałem dla aktywnej formy polimerazy II RNA, który zmniejsza się w kolejnych stadiach cyklu (Ryc.14). Wynik ten sugeruje, że szczytowa synteza *de novo* poli(A)RNA przypada na pierwsze, najdłuższe stadium cyklu. Po upływie około 8-9 dni rozpoczyna się stopniowy eksport poli(A)RNA do cytoplazmy, co oznacza przejście do stadium 2 –

początkowego etapu dynamicznych zmian. Następne stadia (2, 3, 4 i 5) trwają krótko, jedynie kilka do kilkunastu godzin każde (Ryc.13). Można zatem przypuszczać, że w przypadku większości transkryptów, gdy komórka „podejmie decyzję” o konieczności ekspresji mRNA, kolejne etapy zachodzą szybko, najprawdopodobniej w celu przyspieszenia syntezy produktów ekspresji (Rudzka i wsp. 2022).



Ryc. 13 Cykl syntezy i eksportu poli(A)RNA z uwzględnieniem czasu trwania poszczególnych stadiów. Poliadenylowane RNA podczas stadium 1 jest zlokalizowane prawie wyłącznie w jądrze (zarówno w nukleoplazmie, jak i w ciałach Cajala), w tym momencie obserwowana jest również wzmożona aktywność transkrypcyjna. W stadium 2 i 3 poli(A)RNA transportowane jest do cytoplazmy; podczas pierwszego z tych etapów poli(A)RNA jest nadal obecne w dużych ilościach w jądrze, podczas gdy na kolejnym etapie większość jest już wyeksportowana na teren cytoplazmy. Stadium 4 oraz 5 charakteryzują się niskimi poziomami poli(A)RNA w nukleoplazmie i wysokimi poziomami w cytoplazmie, dodatkowo w stadium 5 nie obserwuje się nagromadzenia poliadenylowanego RNA w ciałach Cajala. CB — ciało Cajala (ang. Cajal body), Nu — jąderko (ang. nucleolus).



Ryc. 14 Rozmieszczenie aktywnej formy polimerazy RNA II podczas cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały) – marker ciał Cajala - dodatkowy wskaźnik służący do określenia stadiów cyklu. Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala—10 μ m.

Podsumowanie rozdziału:

1. Pojedynczy cykl syntezy i eksportu poli(A)RNA trwa od 10 do 11 dni.
2. Najdłuższym etapem jest stadium 1 trwające od 8-9 dni, kolejne stadia trwają po około kilkanaście godzin każde.

3. Duża pula jądrowego poli(A)RNA obserwowana w stadium 1 koreluje z dużą pulą aktywnej polimerazy II RNA. Pula polimerazy znacznie zmniejszała się w stadiach kolejnych, co sugeruje, że szczytowa synteza *de novo* poli(A)RNA przypada na pierwsze, najdłuższe stadium cyklu.

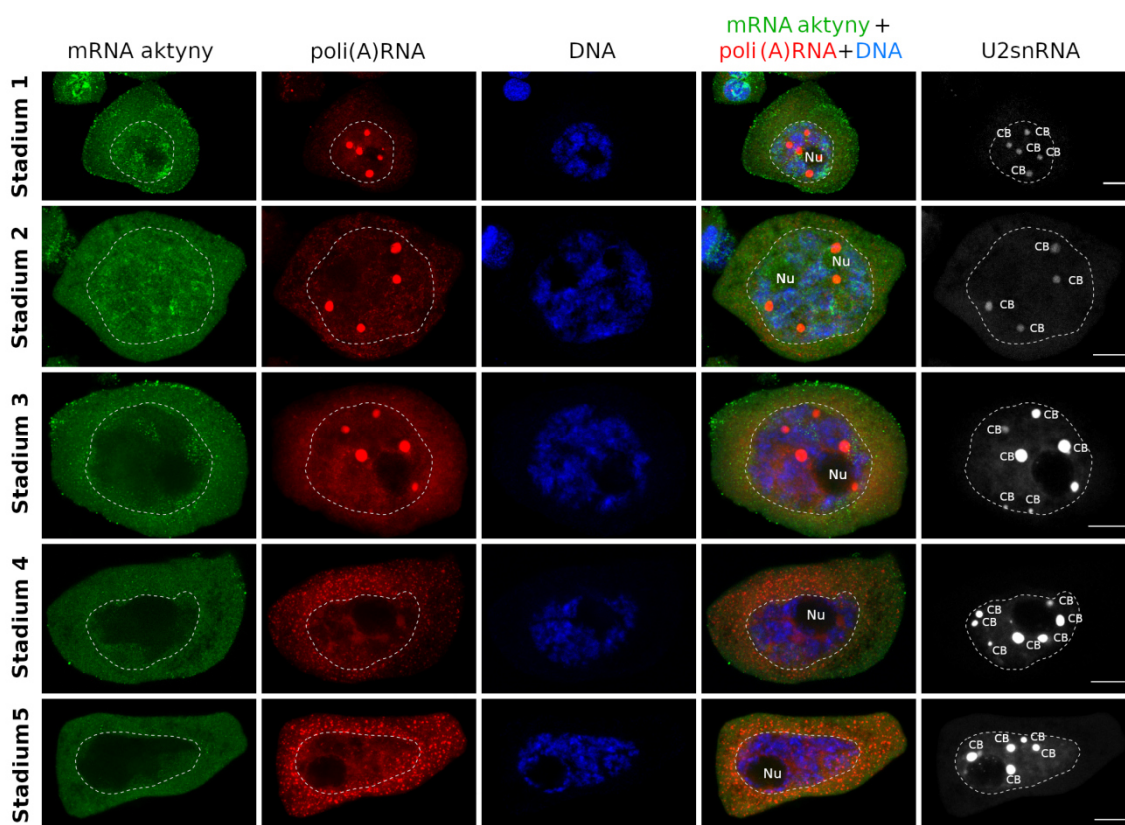
5.2 Dwa główne wzorce syntezy i eksportu mRNA

Przedstawione powyżej wyniki dotyczą całkowitej puli poliadenylowanych transkryptów podczas pojedynczego cyklu syntezy i eksportu mRNA. W prowadzonych badaniach podjęto również próbę sprawdzenia jak taki cykl przebiega dla poszczególnych mRNA. Wcześniejsza analiza funkcjonalna transkryptomu cytoplazmatycznego wykazała, że wśród transkryptów cytoplazmatycznych wyróżnić można pięć głównych grup mRNA kodujących białka związane z: (1) transkrypcją i modyfikacjami posttranskrypcyjnymi; (2) rybosomami, modyfikacjami translacyjnymi i posttranslacyjnymi białek; (3) mitochondriami i przemianami energii; (4) fotosyntezą i plastydami; oraz (5) cytoszkieletem i ścianą komórkową (Rudzka 2020). Do szczegółowej analizy wybrano mRNA kodujące białka zaangażowane w najważniejsze procesy biologiczne (zidentyfikowane na podstawie kategorii GO) i sprawdzono wzorzec ekspresji konkretnych mRNA w odniesieniu do globalnej retencji wszystkich poliadenylowanych transkryptów. W oparciu o dane transkryptomiczne zaprojektowano sondy komplementarne do sekwencji eksonowych badanych mRNA a następnie przeprowadzono reakcję *in situ* hybrydyzacji.

Analizie poddano mRNA kodujące następujące białka: (1) związane z metabolizmem RNA: RPB10 —podjednostka polimerazy RNA II, SERRATE— białko zaangażowane w alternatywny splicing i szlak biogenezy mikroRNA, (2) związane z translacją: eF1a—czynnik elongacji translacji 1a, (3) związane z cytoszkieletem: ACT—aktyna, oraz (4) związane z organizacją organelli: SDH—dehydrogenaza bursztynianowa. Na podstawie czasu spędzonego w jądrze oraz zapoczątkowania momentu eksportu, wyróżniono dwa główne wzorce syntezy i eksportu mRNA.

Pierwszy z wzorców charakteryzował się długim czasem jądrowej retencji, aż do 3/4 stadium 3/4 cyklu, oraz wczesnym rozpoczęciem eksportu tj. w stadium 1.

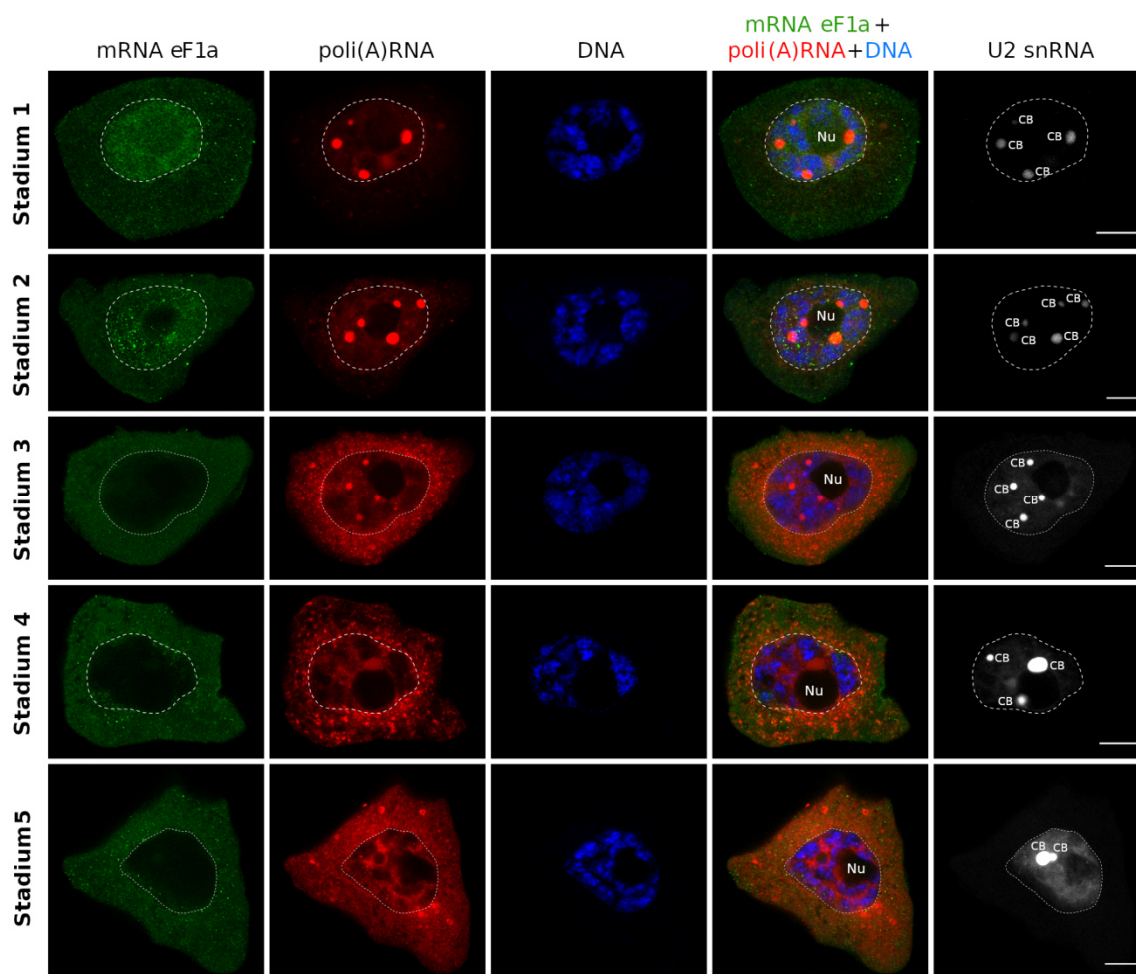
Do mRNA charakteryzujących się tym wzorcem ekspresji należały: mRNA kodujące RBP10 oraz ACT (Ryc.15). Ten sam wzorzec retencji stwierdzono również dla mRNA kodujących białka: SNRP27, PER40, DNJ, PEP, PABP4 (Rudzka 2020; Wróblewska-Ankiewicz dane niepublikowane).



Ryc. 15 Pierwszy wzorzec syntezy i eksportu mRNA. Dystrybucja mRNA kodującego białko aktynę podczas cyklu poli(A)RNA. mRNA aktyny (zielony) pozostaje w jądrze do stadium 3 cyklu. Eksport rozpoczyna się w stadium 1 i mRNA aktyny jest obecne w cytoplazmie do końca cyklu. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala—10 μ m.

Drugi wzorzec w przeciwieństwie do pierwszego charakteryzował się krótkim okresem jądrowej retencji (do drugiego stadium cyklu) oraz późniejszym rozpoczęciem eksportu mRNA (od drugiego/trzeciego stadium). Ten profil ekspresji był charakterystyczny dla mRNA kodującego białko eF1a (Ryc.16) oraz SERRATE (Ryc.17). Ten sam wzorzec retencji wykazano dla mRNA kodującego czynniki translacyjne takiej jak: RS6, eIF5b (Rudzka 2020; Wróblewska-Ankiewicz dane niepublikowane). W przypadku

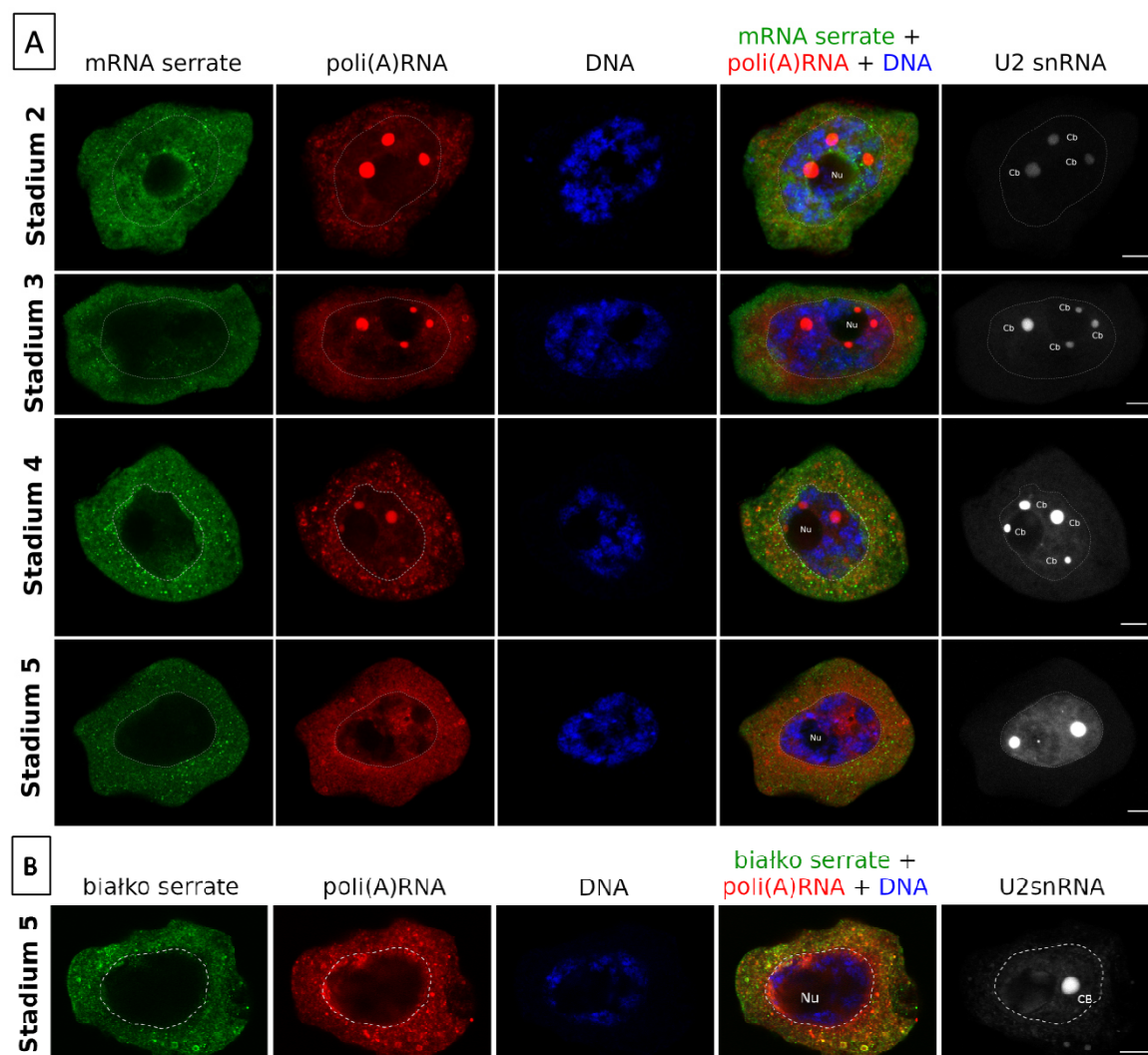
obu przedstawionych wzorców cytoplazmatyczna pula danego mRNA wzrastała z czasem aż do samego końca cyklu.



Ryc. 16 Drugi wzorec syntezy i eksportu mRNA. Rozkład mRNA kodującego czynnik eF1a podczas cyklu poli(A)RNA. mRNA eF1a (zielony) pozostaje w jądrze do stadium 2 cyklu a następnie na przełomie stadium 2 i 3 jest natychmiastowo eksportowane na teren cytoplazmy. mRNA jest obecne w cytoplazmie do końca cyklu. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala—10 μ m.

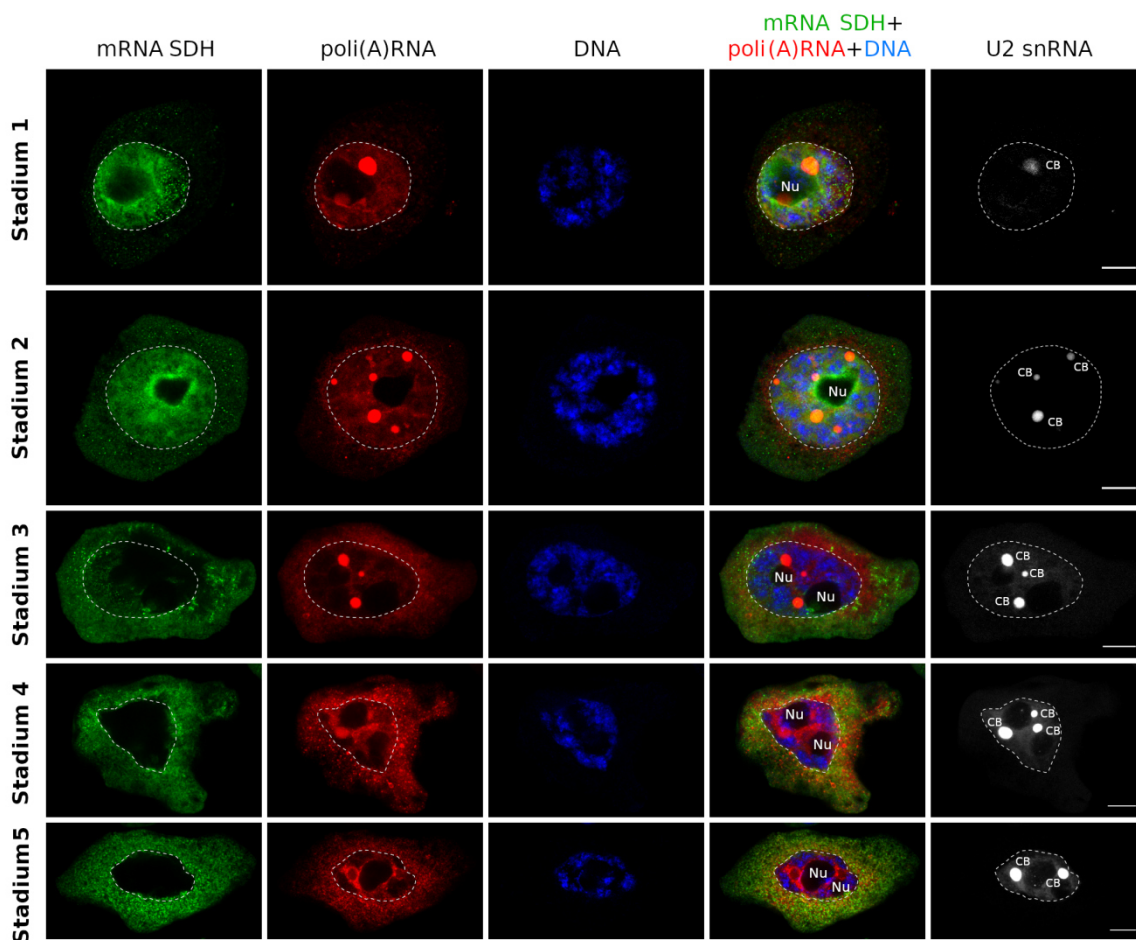
W przypadku mRNA kodującego białko SERRATE oprócz analizy dystrybucji tych mRNA wykonano również reakcję immunoznakowania, aby sprawdzić czy mRNA podlegające retencji wykorzystywane są ostatecznie do syntezy białek. Wyniki ujawniły, że masowy eksport mRNA kodującego białko SERRATE do cytoplazmy w stadium 3 i 4 cyklu

(Ryc.17A) poprzedza moment pojawienia się białka SERRATE w cytoplazmie pod koniec cyklu (Ryc.17B).



Ryc. 17 Analiza mRNA SERRATE i białka SERRATE w cyklu poli(A)RNA. (A) mRNA SERRATE (zielony) jest zatrzymywane w jądrze do stadium 2 cyklu poli(A)RNA i natychmiastowo eksportowane na teren cytoplazmy na przełomie stadium 2 i 3. Transkrypty są obecne w cytoplazmie, aż do końca cyklu. (B) Zatrzymane mRNA są eksportowane do cytoplazmy a następnie, pod koniec cyklu, ulegają translacji. W stadium 5 białka SERRATE są syntetyzowane w dużych ilościach w cytoplazmie z puli mRNA przetworzonej w cyklu. Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). CB – ciało Cajala, Nu – jąderko. Skala – 10 μ m.

Oprócz dwóch dominujących wzorców, zaobserwowano także inne, odbiegające od nich, co sugeruje możliwość precyzyjnej adaptacji systemu do zapotrzebowania na specyficzne białko w odpowiednim czasie. Były one jednak reprezentowane przez znacznie węższą liczbę transkryptów. Przykładem mRNA o alternatywnym wzorcu syntezy i eksportu jest mRNA kodujące białko SDH (Ryc.18). W przypadku transkryptów kodujących białko SDH, mRNA obecne było na terenie jądra do 3 stadium cyklu a eksport odbywał się na przełomie 2 oraz 3 stadium.



Ryc. 18 Alternatywny wzorec syntezy i eksportu mRNA. Rozkład mRNA SDH podczas cyklu poli(A)RNA. mRNA SDH (zielony) jest obecne w jądrze do 3 stadium cyklu poli(A)RNA, a eksport rozpoczyna się na przełomie stadium 2 i 3. mRNA jest obecne na terenie cytoplazmy od drugiego stadium aż do końca cyklu. Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). CB — ciało Cajala, Nu — jąderko . Skala – 10 μ m.

Poza występowaniem odmiennych wzorców syntezy i eksportu poszczególnych mRNA, warto tutaj zwrócić uwagę na różnice w lokalizacji określonych transkryptów w obrębie kompartmentów jądrowych. Charakterystyczny obraz wyraźnej akumulacji całkowitej puli poliadenylowanych transkryptów na terenie ciał Cajala oraz ich występowania na terenie cytoplazmy nie zawsze pokrywał się z obrazem uzyskanym dla mRNA kodującego ściśle określone białko. W pewnych przypadkach zaobserwowano powielenie tego specyficznego wzorca dystrybucji (np. dla mRNA kodujących eF1a czy RPB10), natomiast w przypadku niektórych analizowanych mRNA, rozkład ten był odmienny. Przykładowo mRNA kodujące aktynę (Ryc.15), nie akumulowało się wyraźnie na terenie ciał Cajala. Ich poziom był porównywalny zarówno na terenie nukleoplazmy jak i CB.

Podsumowanie rozdziału:

1. Przeprowadzona analiza pozwoliła na wyróżnienie dwóch głównych wzorców ekspresji mRNA w mikrosporocytach modrzewia; pierwszy wzorec (transkrypty długoretencyjne) – długi czas retencji oraz wczesny eksport, drugi wzorec (transkrypty krótkoretencyjne) – krótki okres retencji oraz opóźniony eksport mRNA.
2. Reakcja immunoznakowania białka SERRATE wykazała, że mRNA podlegające retencji ostatecznie są wykorzystywane jako matryca do syntezy kodowanego przez nie białka.
3. Zobserwowano również istnienie alternatywnych wzorców, co sugeruje możliwość precyzyjnej adaptacji systemu do zapotrzebowania na specyficzne białko w odpowiednim czasie.

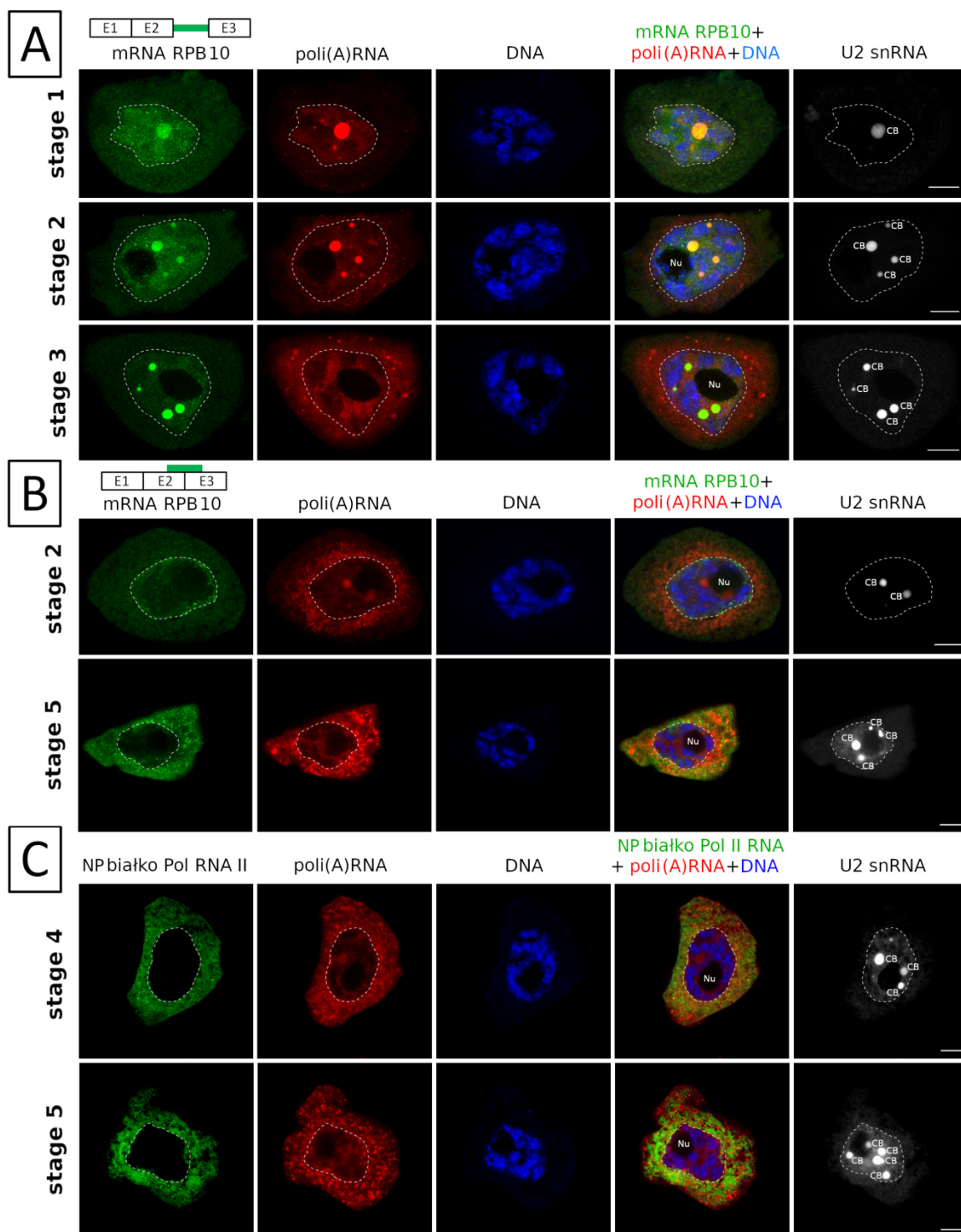
5.3 Ciała Cajala jako miejsce akumulacji niedojrzałych form transkryptów

5.3.1 Szczegółowa analiza transkryptów kodujących białka podjednostki RPB10 polimerazy RNA II

Badania przeprowadzone we wcześniejszych latach wykazały akumulację niedojrzałych form mRNA kodujących białka: SmD1, SmD2 i SmG (Rudzka i wsp. 2022), głównie w obrębie molekularnych kondensatów jakimi są ciała Cajala. Ze względu na opisywane powyżej odmienne wzorce lokalizacji retencyjnych mRNA, w kolejnym kroku sprawdzono, czy akumulacja mRNA na terenie CB może mieć związek ze stopniem ich dojrzałości. Bazując na wcześniejszych wynikach przypuszczano, że akumulacja w obrębie MLO, może być charakterystyczna głównie dla pre-mRNA, które wymagają jeszcze dodatkowego post-transkrypcyjnego splicingu by mogły zostać wykorzystane na dalszych etapach do syntezy białka. Aby to potwierdzić analizie poddano liczną grupę transkryptów.

Pierwszym mRNA poddanym szczegółowej analizie było długoretencyjne mRNA kodujące podjednostkę RPB10 polimerazy RNA II. Podjednostka PRB10 jest składnikiem kompleksu polimerazy RNA II (Pol II), który odgrywa kluczową rolę w transkrypcji genów kodujących białka u eukariontów. Polimeraza RNA II jest wieloskładnikowym enzymem odpowiedzialnym za syntezę mRNA, snRNA oraz miRNA, co czyni ją centralnym elementem procesu ekspresji genów. PRB10 bierze udział w formowaniu rdzenia polimerazy RNA II oraz pełni funkcję strukturalną, stabilizując interakcje pomiędzy innymi podjednostkami kompleksu. Białko to jest jedną z mniejszych podjednostek w kompleksie Pol II, ale jego rola jest istotna ze względu na udział w procesach inicjacji, elongacji i zakończenia transkrypcji (Cramer i wsp. 2001). Dokładna analiza tego mRNA wydała się szczególnie interesująca ze względu na obserwowany w badanym modelu pulsacyjny charakter aktywności transkrypcyjnej. Dodatkowo przeprowadzona została również reakcja immunoznakowania do nieufosforylowanej formy białka polimerazy RNA II.

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia ustalono, że retencji podlega pre-mRNA RPB10 z retencyjnym intronem drugim (Ryc.19). Te pre-mRNA ulegały retencji w nukleoplazmie, ale głównym miejscem ich akumulacji były ciała Cajala. Wysokie nagromadzenie tych pre-mRNA w CB obserwowano przez trzy kolejne stadia (1-3) (Ryc.19A). W pełni dojrzałe mRNA RPB10 (po post-transkrypcyjnym splicingu intronu drugiego) pojawiały się na terenie jądra na etapie stadium 2 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA, jednak były obecne tylko i wyłącznie na terenie nukleoplazmy (Ryc.19B). W pełni dojrzałe transkrypty nigdy nie kumulowały się na terenie ciał Cajala. Warto zwrócić tu również uwagę na charakterystyczną lokalizację dojrzałych mRNA na obwodzie jądra komórkowego w stadium 2. Taka peryferyczna lokalizacja na terenie jądra, sugeruje prawdopodobnie przygotowanie dojrzałych transkryptów do eksportu na teren cytoplazmy. W kolejnych etapach ilość mRNA RPB10 w cytoplazmie wzrastała aż do piątego stadium, kiedy to obserwowany sygnał był najsilniejszy. Pojawienie się dużej ilości dojrzałych transkryptów w cytoplazmie korelowało z pojawieniem się dużej puli nieufosforylowanej formy białka polimerazy RNA II w tym samym przedziale komórkowym (Ryc.19C). Dane te sugerują, że najprawdopodobniej jest to moment, w którym są syntetyzowane poszczególne białka polimerazy II RNA, a następnie są składane w gotowe do użycia enzymy. Wyniki te stanowią potwierdzenie, że retencyjne pre-mRNA RPB10 są w pełni funkcjonalne, ponieważ po okresie akumulacji w CB są one uwalniane do cytoplazmy, gdzie podlegają dalszej ekspresji.



Ryc. 19 Szczegółowa analiza mRNA kodującego podjednostkę RPB10 polimerazy RNA II i nieufosforylowanego białka polimerazy RNA II (ang. non-phosphorylated, NP). (A) Dystrybucja pre-mRNA kodującego polimerazę RNA II z retencyjnym intronem drugim w porównaniu do ogólnej puli poliadenylowanych transkryptów. Znakowanie sekwencji intronu drugiego obecnego w mRNA (zielony) wykazało, że sekwencja ta ulega akumulacji w nukleoplazmie oraz ciałach Cajala od pierwszego do trzeciego stadium cyklu

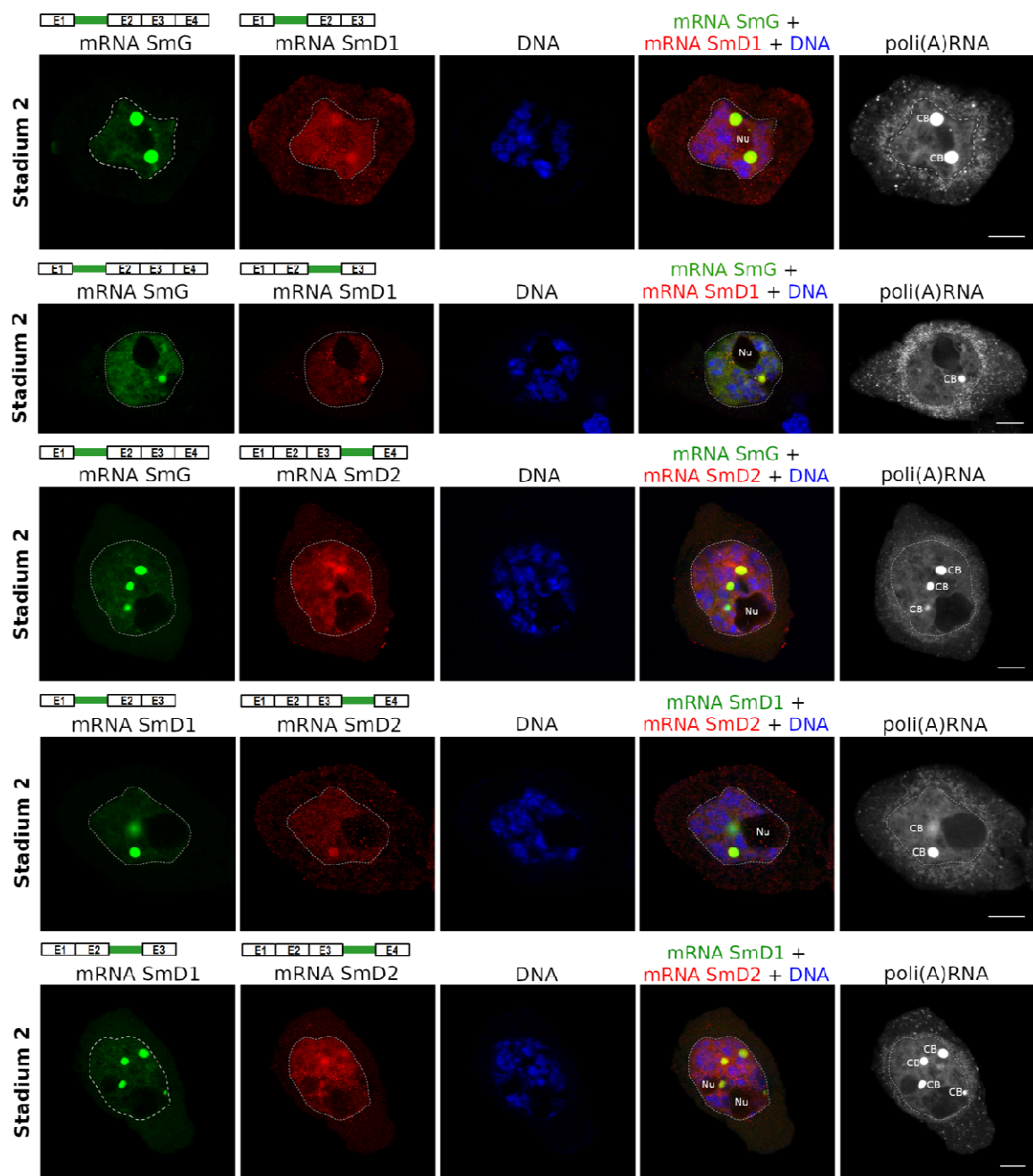
poli(A)RNA. Symbole E1, E2, E3 reprezentują odpowiednio pierwszy, drugi i trzeci ekson transkryptu. Zielona linia oznacza sekwencję drugiego (retencyjnego) intronu, do wykrycia której użyto komplementarnej sondy. (B) Po usunięciu zatrzymanego intronu, mRNA nie gromadzą się już w ciałach Cajala. Dojrzałe mRNA kodujące podjednostkę RPB10 polimerazy RNA II są nieobecne w ciałach Cajala we wszystkich stadiach. Podczas stadium 1 i 2 obecne są w nukleoplazmie, przy czym w stadium 2 wyraźnie koncentrują się przy błonie jądrowej. W stadium 4 i 5 są obecne głównie w cytoplazmie. Zielona linia oznacza fragment sekwencji końca 3' eksonu drugiego (E2) i fragment sekwencji końca 5' eksonu trzeciego (E3). Sonda komplementarna do tej sekwencji (E2-E3) hybrydyzuje, wykrywając transkrypt po splicingu intronu drugiego. (C) Zatrzymane mRNA są eksportowane do cytoplazmy i podlegają translacji. Nowe nieufosforylowane białka polimerazy RNA II są syntetyzowane w dużych ilościach w cytoplazmie z puli mRNA przetworzonej w cyklu. Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA - (biały). CB- ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μ m.

5.3.2 Pre-mRNA kodujące różne białka Sm ulegają retencji w tym samym czasie i akumulują się w tych samych miejscach

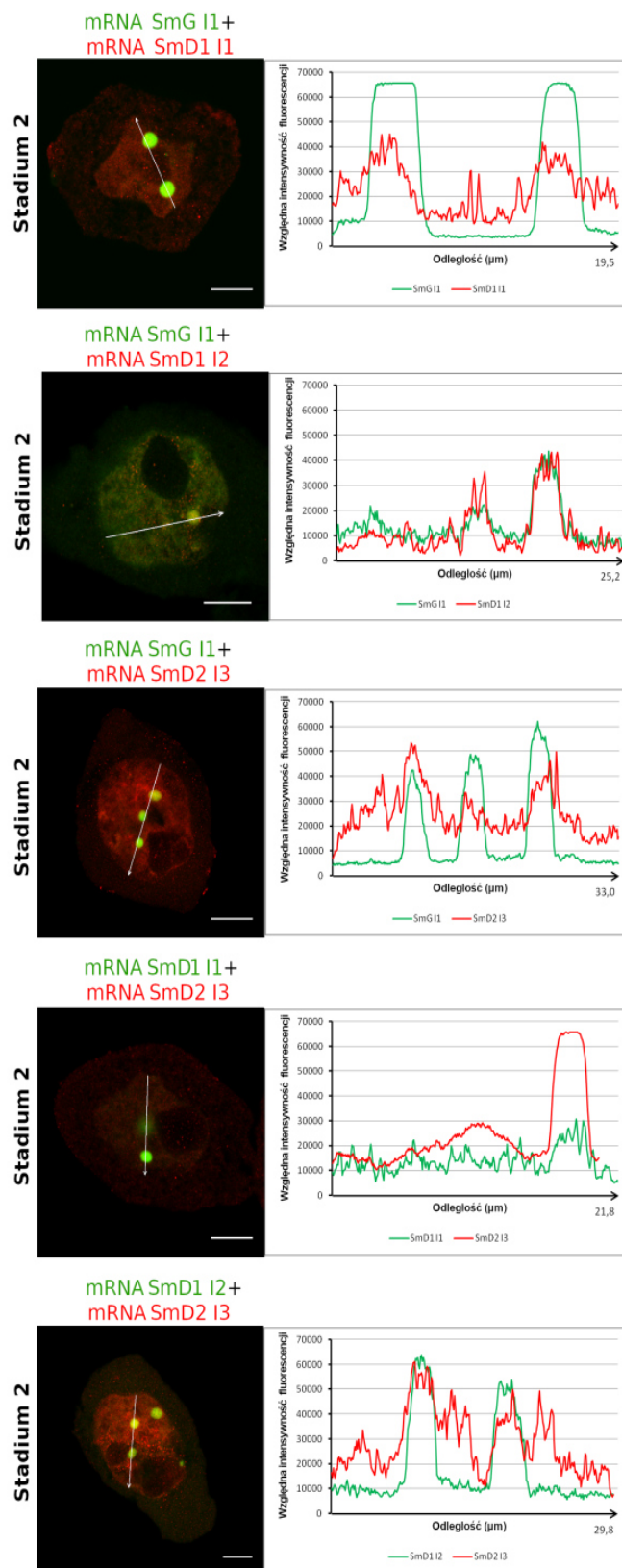
Wcześniejsze badania wykazały akumulację nie w pełni dojrzałych form mRNA kodujących białka Sm, głównie w obrębie molekularnych kondensatów jakimi są ciała Cajala (Rudzka i wsp. 2022). Badania te jednak pokazywały lokalizację pojedynczych retencyjnych mRNA, nie pokazując czy proces retencji różnych mRNA kodujących białka Sm przebiega w komórkach w taki sam sposób. W celu uzyskania takiej informacji opracowano technikę, która pozwoliła na lokalizację dwóch sond znakowanych digoksygeniną skierowanych do dwóch różnych mRNA - multi-indirect FISH (szczegóły poniżej).

Wcześniejsze badania wykazały, że retencyjnymi formami mRNA kodującymi białka Sm są: mRNA kodujące białko SmD1 z zachowanym zarówno pierwszym jak i drugim intronem, mRNA kodujące białko SmD2 z zachowanym trzecim intronem oraz mRNA kodujące białko SmG z zachowanym pierwszym intronem. Dla wyżej wymienionych mRNA przeprowadzono *in situ* hybrydyzację w taki sposób, aby móc jednocześnie

zlokalizować dwa mRNA kodujące różne białka Sm, w różnych konfiguracjach, na tle poliadenylowanych transkryptów. Przeprowadzona analiza wykazała, że wszystkie badane mRNA ulegały jądrowej retencji w tym samym czasie (Ryc.20). Badane mRNA współwystępowały na terenie nukleoplazmy, niemniej jednak ich kumulacja była najwyższa w ciałach Cajala (Ryc.21). Wyniki te sugerują zaangażowanie tych domen jądrowych w retencję nie w pełni dojrzałych mRNA.



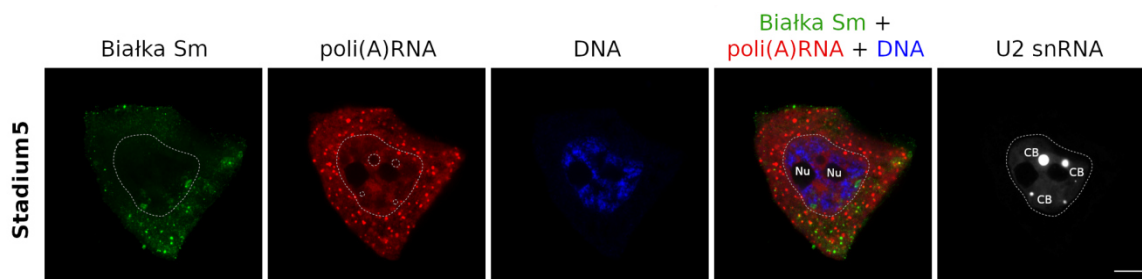
Ryc. 20 Retencja pre-mRNA Sm zachodzi głównie w ciałach Cajala. Pre-mRNA SmG, SmD1 i SmD2 zostały wyznakowane przy użyciu sondy komplementarnej do intronu wskazanego na diagramie powyżej każdego panelu (zielony i czerwony). DNA (niebieski), poli(A)RNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μ m.



Ryc. 21 Porównanie rozmieszczenia różnych form mRNA Sm. Profile intensywności fluorescencji wzdłuż wyznaczonej białej linii.

Dotychczasowe badania wskazują, że istnieje szczególna korelacja pomiędzy akumulacją tych pre-mRNA w CB a pojawieniem się mRNA w cytoplazmie. Maksymalny poziom pre-mRNA białek Sm w ciałach Cajala odnotowano w stadium 3, kiedy to pula cytoplazmatyczna mRNA jest bardzo niska. W kolejnym stadium poziom pre-mRNA CB gwałtownie spada, a poziom cytoplazmatycznego mRNA wzrasta, co może wskazywać na eksport tych mRNA na teren cytoplazmy (Rudzka i wsp. 2022).

Aby sprawdzić czy dojrzałe mRNA białek Sm obecne na terenie cytoplazmy ulegają translacji (podobnie jak transkrypty kodujące podjednostkę RPB10 i białko SERRATE), przeanalizowano dystrybucję białek Sm w mikrosporocytach modrzewia podczas trwania cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Najwyższy poziom znakowania białek na terenie cytoplazmy, które możemy uznać jako nowopowstałe białka, tuż po translacji, obserwowany był w stadium 5 cyklu (Ryc.22). Jak wykazały wcześniejsze badania jest to moment, w którym obserwuje się wysoki poziom w pełni dojrzałego mRNA na terenie cytoplazmy, a w jądrze nie ma już retencyjnych pre-mRNA (Rudzka i wsp. 2022).



Ryc. 22 Lokalizacja białek Sm w stadium 5 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. W ostatnim stadium cyklu białka Sm znajdują się głównie na terenie cytoplazmy. Białka Sm (zielony), poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μ m.

Powyższe wyniki sugerują, że akumulowane w CB retencyjne formy pre-mRNA najprawdopodobniej pełnią funkcję regulacyjną, kontrolując czas eksportu mRNA, a tym samym czas syntezy ściśle określonych białek. Synteza białek Sm na końcu cyklu mogłaby zapewniać dostępność dużej ilości czynników splicingowych, które będą

niezbędne na początku następnego cyklu, kiedy aktywność transkrypcyjna ponownie osiąga wysoki poziom.

Opracowanie techniki multi-indirect FISH

Opracowanie efektywnej metody multi-indirect FISH stanowiło spore wyzwanie tej części badań. Początkowe próby, zakładające jednoczesne wykorzystanie mysiego przeciwciała pierwotnego anti-DIG dla jednego z mRNA oraz króliczego przeciwciała pierwotnego anti-DIG dla drugiego lokalizowanego mRNA, nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Użycie przeciwciała mysiego nigdy nie skutkowało uzyskaniem spodziewanego sygnału w komórce. W związku z tym ostatecznie zdecydowano się na zastosowanie króliczych przeciwciał dla obu wykrywanych sond zanakowanych digoksygeniną wykrywających dwa różne mRNA.

Aby zapobiec krzyżowemu wiązaniu się przeciwciał, najpierw przeprowadzono reakcję FISH z użyciem jednej z dwóch sond zanakowanych digoksygeniną, a następnie wykonano immunoznakowanie z wykorzystaniem króliczego przeciwciała pierwotnego anti-DIG oraz koziego przeciwciała wtórnego anti-króliczego, zanakowanego barwnikiem fluorescencyjnym. Po całkowitym wysyceniu miejsc wiązania króliczego przeciwciała pierwotnego anti-DIG przez przeciwciało wtórne, preparat dokładnie wypłukano po czym przystąpiono do drugiej reakcji FISH z wykorzystaniem drugiej sondy zanakowanej digoksygeniną. Kolejne kroki dotyczące immunoznakowania były identyczne jak w przypadku pierwszej sondy.

Taki protokół pozwolił na zastosowanie króliczych przeciwciał do lokalizacji obu pre-mRNA, eliminując ryzyko krzyżowego wiązania, które mogłoby prowadzić do uzyskania fałszywie dodatnich wyników. Skuteczność metody wysycania przeciwciał została potwierdzona uzyskaniem różnych obrazów fluorescencji dla dwóch reakcji pośredniego znakowania przeprowadzonych w tej samej komórce.

Podsumowanie:

1. Długoretencyjny transkrypt kodujący RPB10, posiada retencyjny intron 2 i ulega akumulacji na terenie ciał Cajala oraz nukleoplazmy. W pełni dojrzała forma tego mRNA obecna była jedynie na terenie nukleoplazmy, poza CB.
2. Pod koniec cyklu dojrzałe transkrypty obecne były głównie na terenie cytoplazmy, gdzie również obecne są duże ilości nieufosforylowanej formy białka polimerazy II RNA, co sugeruje, że w tym czasie dochodzi do translacji mRNA i montażu podjednostek polimerazy.
3. Przeprowadzona reakcja multi-indirect FISH wykazała, że retencja niedojrzałych form różnych mRNA Sm zbiega się w czasie oraz miejscu. Potwierdzono, że to ciała Cajala są głównymi miejscami koncentracji różnych pre-mRNA w tym samym czasie.
4. mRNA, które ulegały jądrowej retencji w początkowych etapach cyklu, są następnie eksportowane i ulegają translacji

5.4 Analiza transkryptomu mikrosporocytów modrzewia

W kolejnym kroku analizie stopnia dojrzałości poddano transkrypty, które kodują białka takie jak: RS2Z32 (białko uczestniczące w regulacji alternatywnego splicingu, stabilności RNA oraz transporcie RNA z jądra do cytoplazmy), THOC4 (białko będące składnikiem kompleksu TREX, którego główną rolą jest stabilizacja oraz eksport mRNA z jądra do cytoplazmy), hnRNP Q-like (białko odgrywające kluczową rolę w procesie splicingu pre-mRNA, wpływające na stabilność mRNA oraz jego eksport z jądra do cytoplazmy) oraz RBM39 (białko wiążące się bezpośrednio z RNA, odgrywające kluczową rolę w regulacji alternatywnego splicingu oraz innych procesów związanych z RNA).

Analiza danych transkryptomicznych pozyskanych w latach wcześniejszych ujawniła istnienie potencjalnych intronów retencyjnych w transkryptach kodujących wymienione powyżej białka (Dane dostępne są w repozytorium RepOD pod identyfikatorem DOI: 10.18150/OT1YUD). Identyfikacja tych intronów była możliwa dzięki mapowaniu uzyskanych odczytów do genomu blisko spokrewnionego gatunku –

świerka pospolitego (*Picea abies*). Świerk pospolity, podobnie jak modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.), należy do rodziny sosnowatych (*Pinaceae*) i podrodziny *Pinoideae*. Mimo że ich linie ewolucyjne zaczęły się rozdzielać około 50-60 milionów lat temu, ich genom wykazuje wysoką homologię sekwencji nukleotydowych, co pozwala na efektywne wykorzystanie danych genomowych świerka do analizy genów modrzewia (Ran i wsp. 2018).

W pierwszym etapie przeprowadzono mapowanie wybranych odczytów z wykorzystaniem platformy ConGenIE.org, umożliwiającej dostęp do genomu *Picea abies*. Analiza ta pozwoliła na identyfikację potencjalnych intronów podlegających retencji w części badanych sekwencji oraz na precyzyjne określenie granic pomiędzy eksonami i intronami. Następnie, po przygotowaniu bazy obejmującej informacje ze wszystkich uzyskanych transkryptomów (Baza danych sekwencji zawierających retencyjne introny: (<http://rhesus.amu.edu.pl/sharing/logowanie.php?id=009bb6d03c>), odrębnych dla poszczególnych stadiów syntezy i eksportu poli(A)RNA – podjęto kolejną próbę identyfikacji transkryptów zawierających retencyjne introny, wstępnie wyselekcjonowanych na podstawie analizy przeprowadzonej przy użyciu platformy Congenie. Kluczowym kryterium włączenia transkryptu do bazy pre-mRNA z retencyjnymi intronami była obecność zarówno wariantu z intronem, jak i wariantu pozbawionego tego intronu w co najmniej jednej z analizowanych prób. Transkrypty, w których nie wykryto formy pozbawionej intronu, zostały wykluczone z dalszej analizy. Dzięki temu baza obejmowała wyłącznie te pre-mRNA, które stanowią źródło dojrzałych, funkcjonalnych transkryptów. Ostateczna analiza bioinformatyczna wykazała obecność retencyjnych intronów w obrębie 12 854 genów.

Na podstawie tych danych zaprojektowano oligonukleotydowe sondy i primery komplementarne zarówno do sekwencji intronowych, jak i sekwencji powstałych po ich wycięciu dla wybranych transkryptów. Te narzędzia posłużyły do śledzenia losów badanych mRNA w komórce oraz przeprowadzenia dodatkowych analiz molekularnych (qPCR, elektroforeza kapilarna, sekwencjonowanie produktów qPCR), mających na celu potwierdzenie obecności różnych form transkryptów.

5.4.1 Walidacja wyników analizy transkryptomu na podstawie wybranych transkryptów

Poniższa tabela stanowi podsumowanie wyników przeprowadzonych analiz dla wszystkich badanych transkryptów (Ryc.23).

pre-mRNA	RS2Z32	THOC4	hnRNP Q-like isoform X1	RBM39
FISH	+	+	+	+
qPCR + bioanalyser	+	+	+	+
sekwencjonowanie produktu	+	+	+	+
mRNA	RS2Z32	THOC4	hnRNP Q-like isoform X1	RBM39
FISH	-	-	-	+
qPCR + bioanalyser	+	+	+	+
sekwencjonowanie produktu	+	+	+	-
analiza transkryptomu (obecność obu form)	RS2Z32	THOC4	hnRNP Q-like isoform X1	RBM39
	+	+	+	-

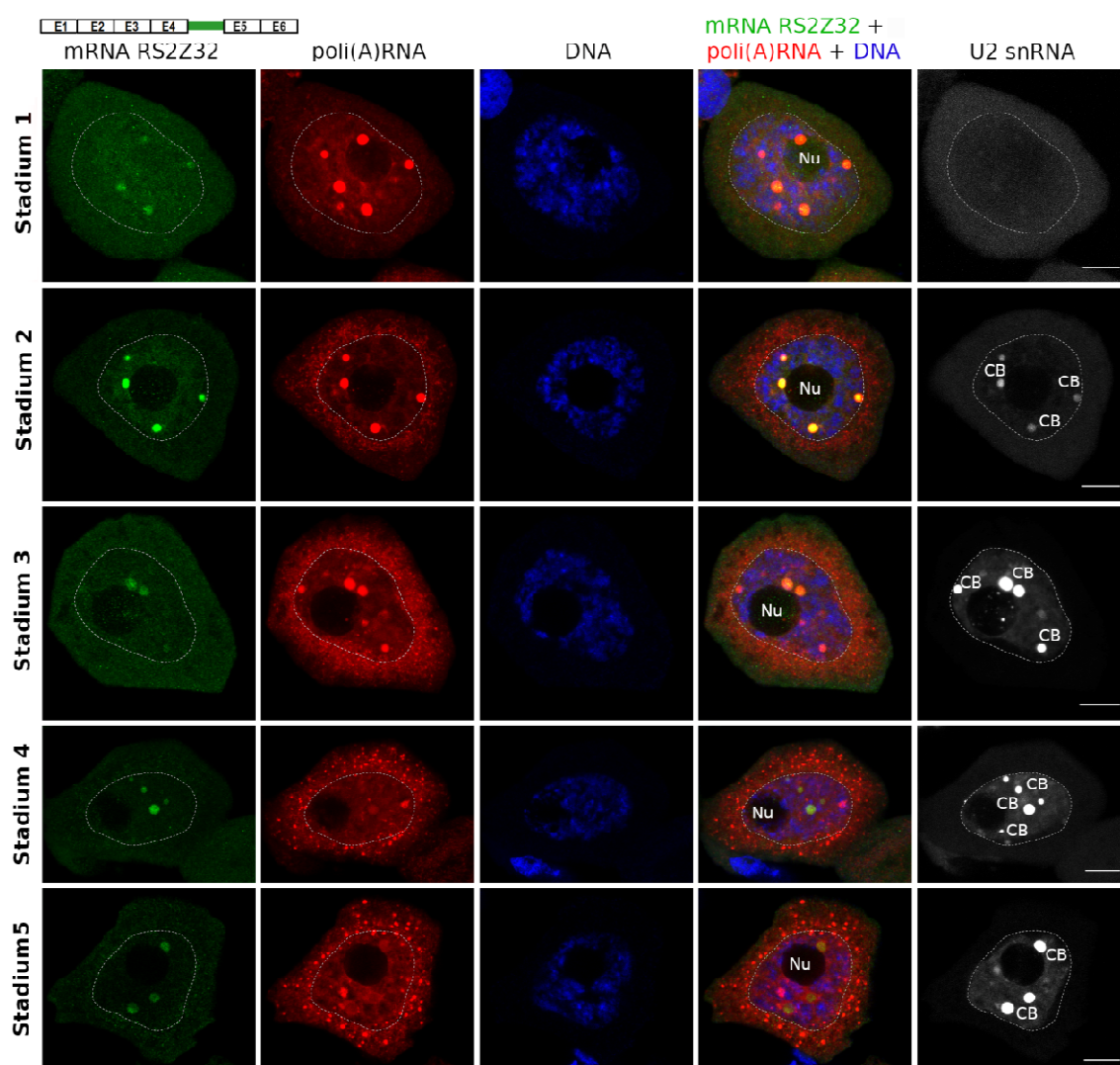
Ryc. 23 Tabela podsumowująca wyniki analiz badanych transkryptów. W górnej części tabeli przedstawiono wyniki dla pre-mRNA uzyskane w analizach FISH, qPCR + bioanalyser oraz sekwencjonowaniu produktów. Środkowa część tabeli zawiera wyniki analiz mRNA. Na dole tablicy zamieszczono informacje o wynikach analizy transkryptomu, w której poszukiwano zarówno sekwencji pre-mRNA, jak i jego dojrzałej formy. Symbol '+' oznacza wynik pozytywny przeprowadzonej analizy, a '-' wynik negatywny.

Pre-mRNA RS2Z32

RS2Z32 należy do rodziny białek bogatych w serynę i arginę (białka SR), które uczestniczą w regulacji alternatywnego splicingu, stabilności RNA oraz transporcie RNA z jądra do cytoplazmy. Jak wszystkie białka z tej rodziny, RS2Z32 posiada charakterystyczne motywy SR, umożliwiające interakcje z innymi białkami oraz wiązanie RNA. Transkrypt kodujący RS2Z32 często podlega alternatywnemu

splicingowi, w wyniku czego powstają różne izoformy o odmiennych właściwościach funkcjonalnych. Izofomy te mogą regulować różne aspekty procesu splicingu, wpływając tym samym na ekspresję genów (Rauch i wsp. 2014).

Analiza danych transkryptomicznych ujawniła obecność retencyjnego intronu czwartego w transkrypcie RS2Z32 (Supl.3; Supl.4). Wyniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* potwierdzają akumulację pre-mRNA RS2Z32 z niewyciętym intronem 4, gromadzącego się w ciałach Cajala oraz w nukleoplazmie (Ryc. 24).



Ryc. 24 Analiza pre-mRNA białka RS2Z32 w cyklu poli(A)RNA. Pre-mRNA RS2Z32 (zielony) ulega akumulacji na terenie jądra komórkowego przez cały czas trwania cyklu. Jednak jego najsilniejsza akumulacja w obrębie CB i nukleoplazmy dotyczy w stadium 2. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem

a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko.
Skala – 10 μm .

Pre-mRNA z retencyjnym intronem 4 obserwowano w jądrze komórkowym przez cały cykl, jednak najsilniejszą akumulację zaobserwowano w stadium drugim, zarówno w ciałach Cajala, jak i nukleoplazmie. Obecność formy pre-mRNA RS2Z32 z niewyciętym intronem 4 potwierdzono również za pomocą analizy qPCR. W tym celu zaprojektowano primery: jeden komplementarny do fragmentu retencyjnego intronu 4, a drugi do sekwencji wewnątrz eksonu 5 (Ryc.25; Supl.5). Następnie otrzymany produkt poddano elektroforezie kapilarnej przy użyciu urządzenia Bioanalyzer. Wyniki tej analizy potwierdziły obecność produktu o przewidywanej długości 111 nukleotydów (Supl.6).

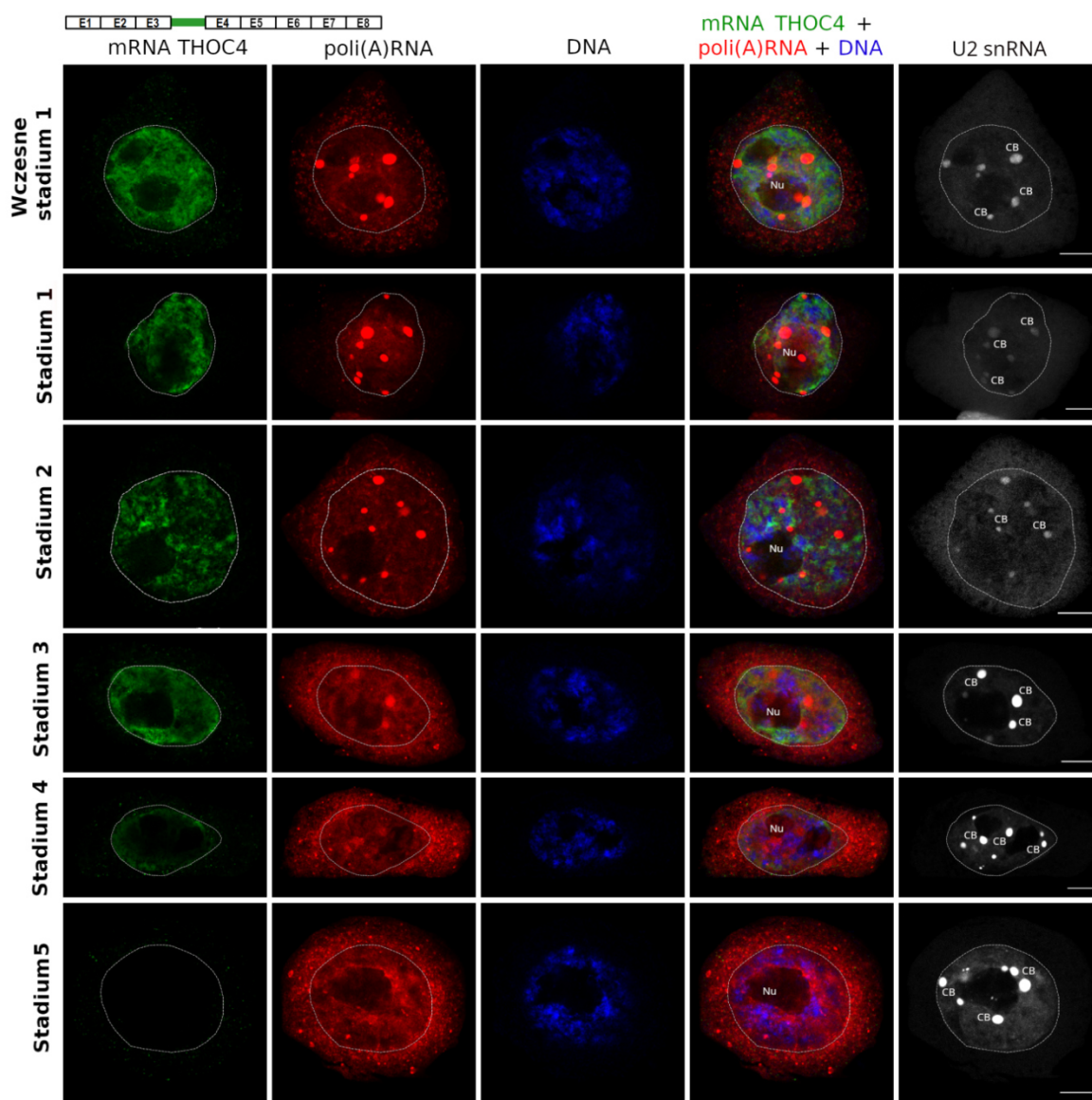


Ryc. 25 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre-mRNA RS2Z32 z zaznaczonymi miejscami przyłączenia zaprojektowanych starterów (na zielono). Sekwencje eksonowe oznaczono kolorem szarym, natomiast retencyjny intron – kolorem różowym. Nad strzałkami przedstawiono przewidywaną długość produktów PCR, wyrażoną w liczbie nukleotydów (nt).

Pre-mRNA THOC4

Białko THOC4 jest składnikiem kompleksu TREX, którego główną rolą jest stabilizacja oraz eksport mRNA z jądra do cytoplazmy. Odgrywa on także istotną rolę w prawidłowym przebiegu procesów transkrypcji oraz splicingu. Podobnie jak w przypadku białka RS2Z32, występują różne izoformy białka THOC4, charakteryzujące się odmiennymi właściwościami i pełniące różne funkcje. To pozwala komórce dynamicznie reagować na zmieniające się warunki wewnętrzne i zewnętrzne (Jimeno i wsp. 2002).

Analiza danych transkryptomicznych wskazywała na obecność retencyjnego intronu trzeciego w transkrypcie kodującym białko THOC4 (Supl.9; Supl.10). Wyniki przeprowadzonej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* potwierdzają obecność pre-mRNA THOC4 z niewyciętym intronem 3, który akumuluje się głównie w nukleoplazmie (Ryc. 26).



Ryc. 26 Analiza pre-mRNA białka THOC4 w cyklu poli(A)RNA. Pre-mRNA THOC4 (zielony) obecne jest na terenie nukleoplazmy od pierwszego do czwartego stadium. Jednak jego najsilniejsza akumulacja w tym przedziale jądrowym obserwowana jest/była w stadiach od 1 do 3. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μ m.

Formę retencyjną tego transkryptu obserwowano w nukleoplazmie od wczesnego stadium pierwszego aż do stadium czwartego. Od tego momentu intensywność fluorescencji zaczynała spadać, aż do całkowitego zaniku w stadium piątym. Należy zauważyć, że w tym przypadku wyjątkowo nie obserwowano akumulacji transkryptów z retencyjnym intronem w ciałach Cajala.

Podobnie jak w przypadku RS2Z32, w celu potwierdzenia istnienia retencyjnej formy pre-mRNA wykonano analizę q-PCR. W tym przypadku jeden z primerów został zaprojektowany w taki sposób, aby wiązał się z fragmentem sekwencji eksonu 3, natomiast drugi był komplementarny do fragmentu znajdującego się wewnątrz intronu 3 (Ryc.27; Supl.11). Uzyskany produkt poddano elektroforezie kapilarnej na urządzeniu Bioanalyzer. Wyniki elektroforezy potwierdziły obecność produktu o oczekiwanej długości 165 nukleotydów (Supl.12).

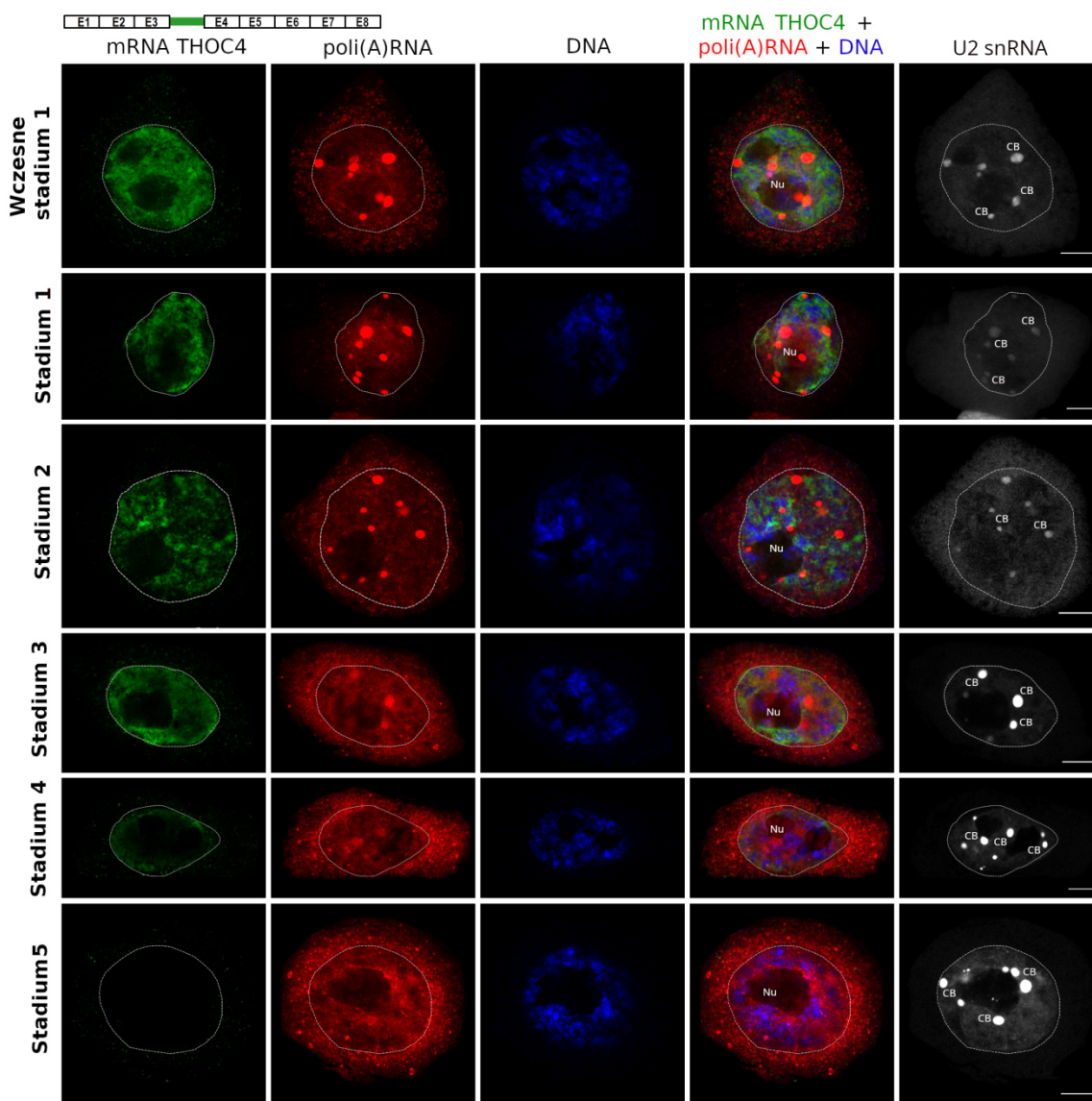


Ryc. 27 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre-mRNA THOC4 z zaznaczonymi miejscami przyłączenia zaprojektowanych starterów (na zielono). Sekwencje eksonowe oznaczono kolorem szarym, natomiast retencyjny intron – kolorem różowym. Nad strzałkami przedstawiono przewidywaną długość produktów PCR, wyrażoną w liczbie nukleotydów (nt).

Pre-mRNA hnRNP Q-like isoform X1

Białko hnRNP Q-like isoform X1 jest jedną z izoform białka należącego do rodziny heterogenicznych jądrowych rybonukleoprotein (hnRNP). Białka te odgrywają kluczową rolę w procesie splicingu pre-mRNA, wpływają na stabilność mRNA, jego eksport z jądra do cytoplazmy, a także na proces translacji. Ze względu na to, że są zaangażowane w wiele etapów przetwarzania mRNA, odpowiednia regulacja ich dostępności ma istotne znaczenie dla prawidłowej ekspresji genów (Geuens i wsp. 2016).

Dane transkryptomiczne wskazywały na obecność retencyjnego intronu siódmego w obrębie transkryptu kodującego białko hnRNP Q-like isoform X1 (Supl.15; Supl.16). Wyniki przeprowadzonej reakcji fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* potwierdziły obecność pre-mRNA hnRNP Q-like isoform X1 z nie wyciętym intronem 7, które ulegają akumulacji na terenie nukleoplazmy oraz ciał Cajala (Ryc.28).



Ryc. 28 Analiza pre-mRNA białka hnRNP Q-like isoform X1 w cyklu poli(A)RNA. Pre-mRNA hnRNP Q-like isoform X1 (zielony) obecne jest na terenie jądra od pierwszego do trzeciego stadium oraz na terenie cytoplazmy we wszystkich stadiach z wyjątkiem stadium 1. Najsilniejszą akumulację pre-mRNA w CB i nukleoplazmie zaobserwowano w stadium 1. Od stadium 1 do stadium 3 intensywności fluorescencji na terenie jądra maleje. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem

a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko.
Skala – 10 μ m.

Akumulacja transkryptu w jądrze była zjawiskiem przejściowym, obserwowanym od stadium 1 do 3, obejmując zarówno ciała Cajala, jak i nukleoplazmę. W kolejnych stadiach odnotowano stopniowy spadek poziomu jądrowego pre-mRNA, któremu towarzyszył jednoczesny wzrost jego obecności w cytoplazmie. Od stadium 2 pojawiał się wyraźny, punktowy sygnał cytoplazmatyczny, utrzymujący się aż do wczesnego stadium 1 kolejnego cyklu.

Aby zweryfikować obecność formy retencyjnej intronu 7, przeprowadzono analizę q-PCR. W tym celu zastosowano primer forward wiążący się z fragmentem sekwencji intronu 7 oraz primer reverse komplementarny do części eksonu 8 (Ryc.29; Supl.17). Uzyskany produkt poddano elektroforezie kapilarnej w Bioanalyzerze, co potwierdziło obecność produktu o oczekiwanej długości 117 nukleotydów (Supl.18).



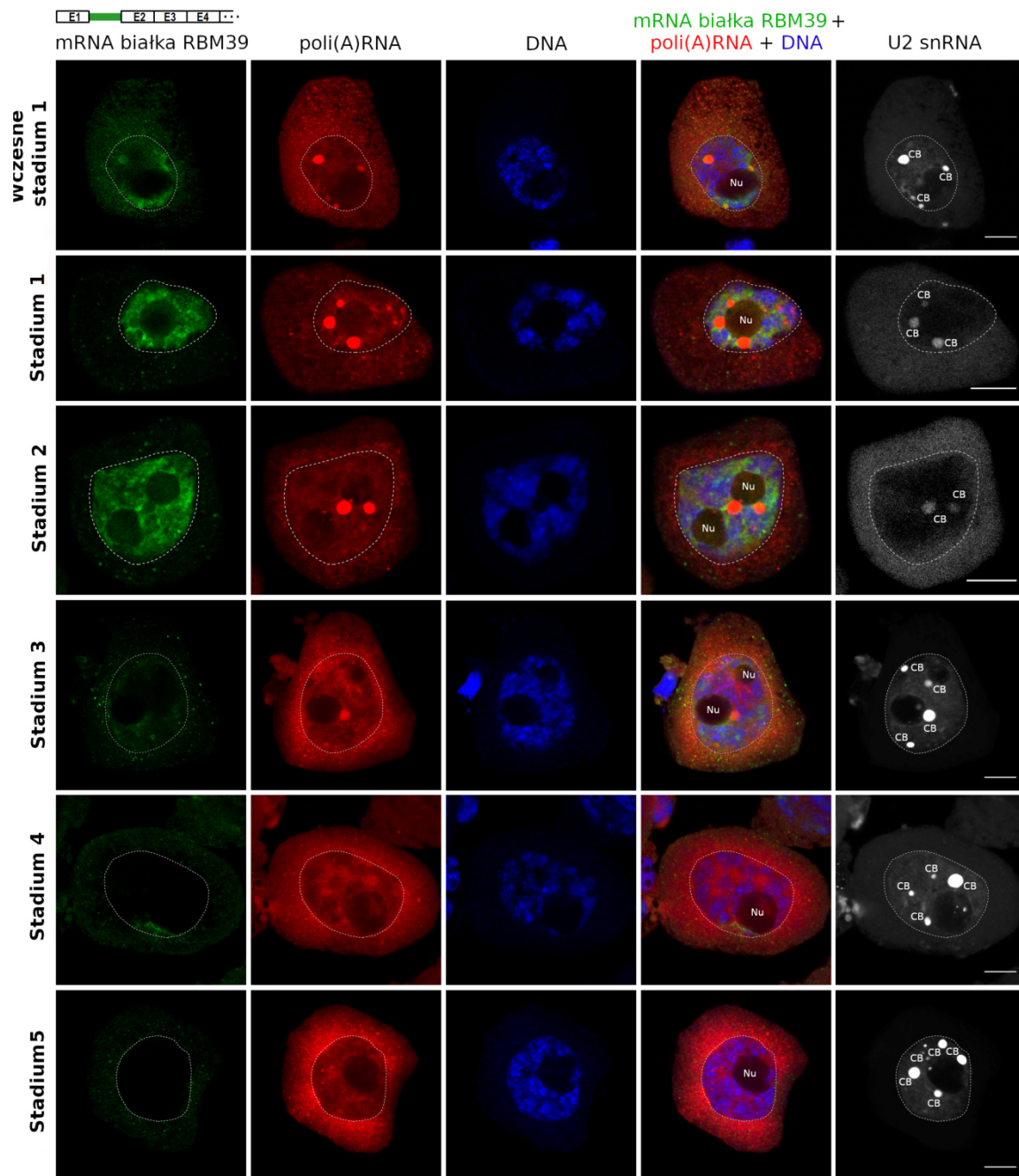
Ryc. 29 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre-mRNA hnRNP Q-like isoform X1 z zaznaczonymi miejscami przyłączenia zaprojektowanych starterów (na zielono). Sekwencje eksonowe oznaczono kolorem szarym, natomiast retencyjny intron – kolorem różowym. Nad strzałkami przedstawiono przewidywaną długość produktów PCR, wyrażoną w liczbie nukleotydów (nt).

Pre-mRNA RBM39

RBM39 to białko wiążące się bezpośrednio z RNA, odgrywające kluczową rolę w regulacji alternatywnego splicingu oraz innych procesów związanych z RNA. Należy do rodziny białek zawierających motywy wiążące RNA, co sprawia, że jest istotne w regulacji ekspresji genów na poziomie post-transkrypcyjnym. RBM39 współdziała

z innymi czynnikami splicingowymi, takimi jak białka SR, a także wpływa na stabilność transkryptów mRNA, co odgrywa ważną rolę w odpowiedzi komórkowej na zmienne warunki środowiskowe lub stres. Działanie RBM39 jest szczególnie istotne w procesach różnicowania komórek, proliferacji oraz odpowiedzi na stres (Wang i wsp. 2008).

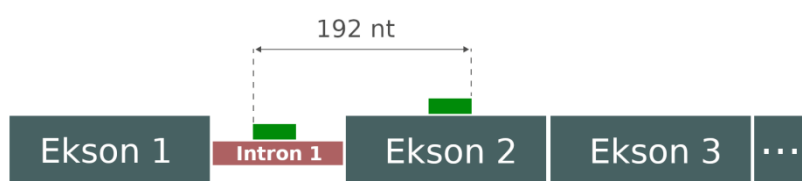
Na podstawie danych transkryptomicznych ustalono obecność retencyjnego intronu pierwszego w obrębie transkryptu kodującego białko RBM39 (Supl.21; Supl.22). Wyniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) wykazały obecność pre-mRNA RBM39 z nie wyciętym intronem 1, które ulegają akumulacji na terenie nukleoplazmy oraz ciał Cajala (Ryc.30).



Ryc. 30 Analiza pre-mRNA białka RBM39 w cyklu poli(A)RNA. Pre-mRNA RBM39 (zielony) w dużej ilości obecne jest na terenie jądra od wczesnego stadium 1 do stadium 2 po czym jego poziom spada aż do końca cyklu. Jego akumulacja dotyczy głównie nukleoplazmy. Sygnał z ciał Cajala obecny jest jedynie we wczesnym stadium 1. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μm .

Nagromadzenie retencyjnych transkryptów w jądrze komórkowym obserwowano od wczesnego stadium pierwszego do końca stadium drugiego. Transkrypty te występowały głównie w nukleoplazmie, choć we wczesnym stadium 1 odnotowano ich obecność również w ciałach Cajala. Od stadium trzeciego aż do końca cyklu zaobserwowano stopniowy spadek intensywności fluorescencji sygnału jądrowego. W stadium 5 cyklu nie odnotowano obecności retencyjnych transkryptów pre-mRNA w komórce.

W celu potwierdzenia wyników przeprowadzono dodatkową analizę przy użyciu qPCR. Zastosowano primer forward wiążący się z fragmentem sekwencji intronu 1 oraz primer reverse komplementarny do części eksonu 2 (Ryc.31; Supl.23). Uzyskany produkt reakcji poddano elektroforezie kapilarnej na urządzeniu Bioanalyzer. Wyniki elektroforezy wykazały obecność produktu o długości 200 nukleotydów, choć spodziewano się produktu o długości 192 nt (Supl.24). W związku z tym podjęto decyzję o przeprowadzeniu sekwencjonowania produktu qPCR, aby upewnić się, że primery są specyficzne względem docelowego target. Wyniki sekwencjonowania potwierdziły specyficzność działania zaprojektowanych primerów – uzyskano sekwencję pre-mRNA kodującego białko RBM39 z retencyjnym intronem pierwszym. Do porównania sekwencji produktu z sekwencją referencyjną użyto programu Clustal Omega udostępnianego przez Europejski Instytut Bioinformatyki EMBL.



Ryc. 31 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre-mRNA RBM39 z zaznaczonymi miejscami przyłączenia zaprojektowanych starterów (na zielono). Sekwencje eksonowe oznaczono kolorem szarym, natomiast retencyjny intron – kolorem różowym. Nad strzałkami przedstawiono przewidywaną długość produktów PCR, wyrażoną w liczbie nukleotydów (nt).

Wyniki hybrydyzacji *in situ* wykazały różnice w stopniu akumulacji badanych pre-mRNA w różnych przedziałach jądrowych, takich jak ciała Cajala i nukleoplazma, a także w czasie ich przebywania w jądrze komórkowym. Zauważalne rozbieżności mogą świadczyć o tym, że każdy z analizowanych genów charakteryzuje się specyficznym wzorcem ekspresji, który zapewnia precyzyjną kontrolę czasu syntezy określonych białek, regulując ich dostępność dla komórki. Taka ścisła kontrola prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w niezakłóconym przebiegu procesów, w których białka te uczestniczą, wspierając prawidłowy rozwój komórek linii generatywnej modrzewia europejskiego.

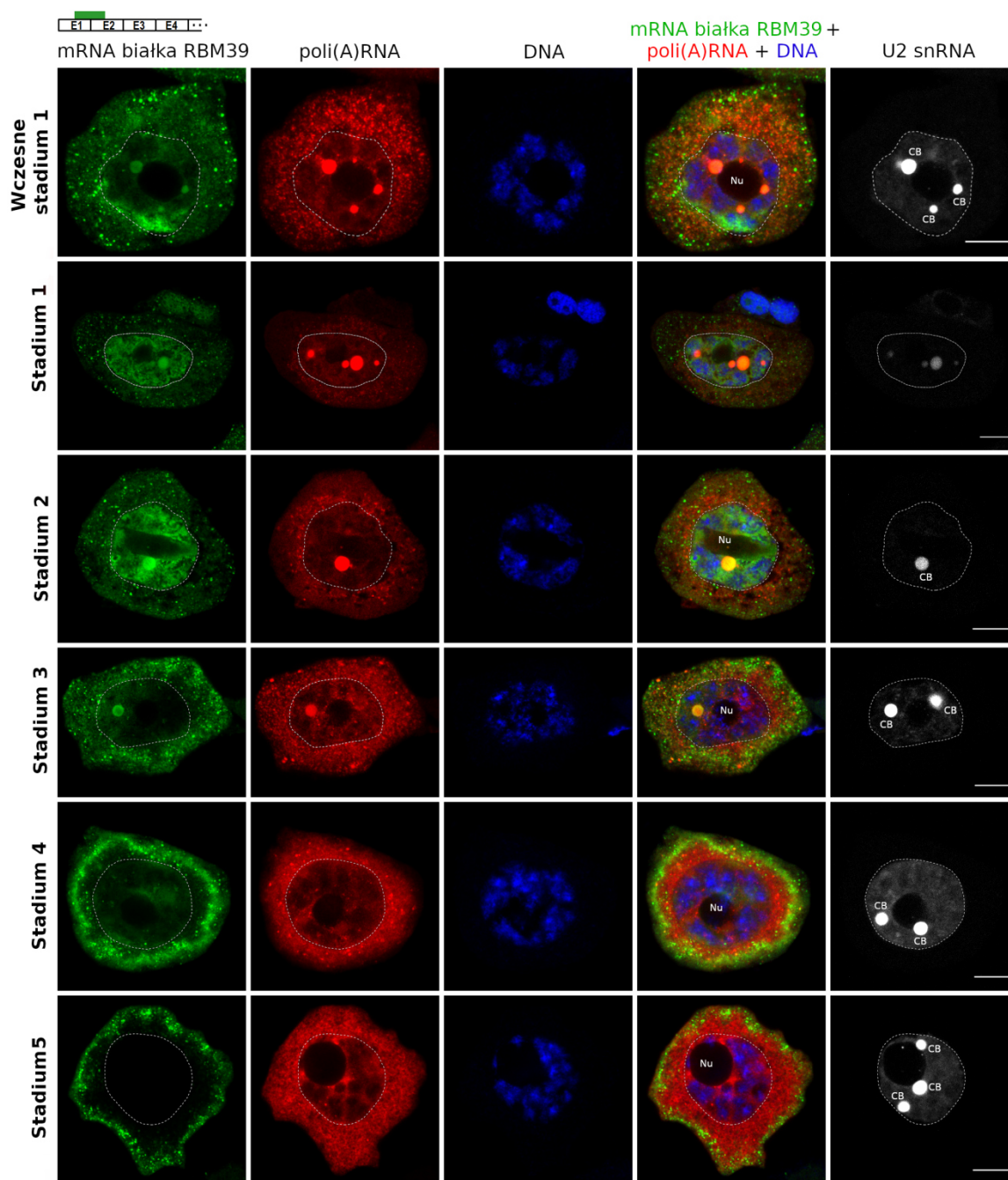
Wyniki te wskazują także, że dla każdego analizowanego pre-mRNA obserwowano stopniowy spadek ich poziomu pod koniec cyklu poli(A)RNA, aż do stadium piątego, gdzie często sygnał zanikał. Wynik ten sugeruje, że transkrypty te mogą przechodzić dodatkowy procesing, prowadzący do usunięcia retencyjnego intronu i wytworzenia dojrzałego mRNA, podobnie jak ma to miejsce w przypadku pre-mRNA białek Sm. Proces ten przebiega z różną szybkością w zależności od wzorca ekspresji poszczególnych transkryptów. Aby potwierdzić hipotezę dotyczącą zachodzenia post-transkrypcyjnego splicingu, dalsza analiza skupiała się na identyfikacji dojrzałych form badanych pre-mRNA.

5.4.2 Wyniki hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem sond komplementarnych do sekwencji powstałych po splicingu intronów retencyjnych

Ponownie, aby upewnić się, że obserwowane zjawisko retencji intronu w badanych pre-mRNA jest tymczasowe i że sekwencje te ostatecznie podlegają post-transkrypcyjnemu splicingowi, podjęto następujące kroki. Wykonano reakcję FISH z użyciem sond komplementarnych do fragmentów 3' końca eksonu poprzedzającego RI oraz 5' końca eksonu za RI (połączenie eksonów po wycięciu retencyjnego intronu). Przeprowadzono również qPCR z primerami umożliwiającymi identyfikację dojrzałej formy badanych transkryptów oraz sekwencjonowanie produktów tej reakcji (Supl.7; Supl.8; Supl.13; Supl.14; Supl.19; Supl.20, Supl.25, Supl.26). Dodatkowo przeszukano

transkryptom w celu identyfikacji form niedojrzałych i dojrzałych dla wszystkich analizowanych mRNA.

Reakcja fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* dała pozytywny wynik w przypadku mRNA kodującego białko RBM39. W stadium 1 dojrzała forma tego mRNA obserwowana była głównie na terenie nukleoplazmy, a od stadium 2 do 3 odnotowano również ich znaczną akumulację na terenie ciał Cajala oraz cytoplazmy. Od stadium 3 do 5 sygnał jądrowy ulegał stopniowemu zmniejszeniu na rzecz wzrastającego sygnału cytoplazmatycznego (Ryc.32).



Ryc. 32 Analiza mRNA białka RBM39 w cyklu poli(A)RNA. mRNA RBM39 (zielony) obecne jest na terenie jądra od wczesnego stadium 1 do stadium 3 po czym jego poziom spada aż do końca cyklu. Jądrowa lokalizacja dotyczy zarówno nukleoplazmy jak i ciał Cajala. Od stadium 2 do końca cyklu obserwowany jest również wzrastający sygnał cytoplazmatyczny. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μ m.

W przypadku pozostałych analizowanych mRNA nie uzyskano sygnału fluorescencji. Przyczyną niepowodzenia pozostałych reakcji FISH mogła być nieprawidłowo działająca sonda lub brak możliwości fizycznego związania się jej z docelową sekwencją. Sondy były bowiem komplementarne do skrajnych fragmentów dwóch przylegających do siebie eksonów. Możliwości zaprojektowania sond w ściśle określonym, wąskim obszarze sekwencji nukleotydowej, obejmującym około 25–40 nukleotydów, z czego mniej więcej połowa musiała być komplementarna do końca 3' jednego eksonu, a druga część do końca 5' kolejnego eksonu, były istotnie ograniczone. Ze względu na tak restrykcyjne kryteria doboru sekwencji, liczba potencjalnych regionów, w których można było zaprojektować sondę, była w praktyce bardzo niewielka. W rezultacie wybór konkretnej sekwencji był w dużej mierze wymuszony przez układ nukleotydów w tym fragmencie. Brak możliwości przesunięcia sondy w inny, bardziej dogodny region powodował, że projektowana sonda była narażona na tworzenie się truktur drugorzędowych, takich jak spinki (*ang. hairpin loops*). W standardowych warunkach, gdy analiza *in silico* wykazuje powstawanie takich struktur, możliwe jest zaprojektowanie sondy w alternatywnym fragmencie sekwencji; tutaj jednak taka modyfikacja nie była możliwa ze względu na wymóg objęcia przez sondę dokładnie tego konkretnego miejsca obejmującego granicę eksonów. Ponad to miejsca połączeń eksonów okupowane są przez białka takie jak: białka SR m.in. stabilizujące połączenia między eksonami (Schlautmann i Gehring 2020), kompleks EJC (*ang. exon junction complex*) stanowiący grupę białek odgrywających istotną rolę w dalszym transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy oraz w procesie kontroli jakości mRNA (np. w mechanizmie NMD – *ang. nonsense-mediated decay*) (Le Hir i wsp. 2000), czy też białka z rodziny hnRNP wpływające na stabilność mRNA, transport czy translację (Geuens i wsp. 2016). Obecność tych białek mogła utrudniać lub uniemożliwiać związanie się sondy z docelową sekwencją RNA. Wobec tych trudności wybrano alternatywną metodę, która umożliwiła ocenę obecności formy dojrzałej analizowanego mRNA.

Pierwszym krokiem, podobnie jak w analizie form z retencyjnym intronem (*ang. retained intron, RI*), było przeprowadzenie reakcji qPCR z primerami zaprojektowanymi dla regionu połączenia eksonów po wycięciu intronu (*ang. exon*

junction, EJ), obejmującymi fragment 3' eksonu poprzedzającego intron oraz fragment 5' eksonu następującego po RI. Dla wszystkich analizowanych mRNA uzyskano produkty różniące się o kilka nukleotydów od oczekiwanej długości. W celu potwierdzenia specyficzności primerów produkty qPCR poddano sekwencjonowaniu. Sekwencjonowanie potwierdziło specyficzność primerów dla mRNA kodującego białka THOC4, RS2Z32 oraz hnRNP Q-like isoform X. Primery dedykowane dla mRNA kodującego RBM39 okazały się jednak niespecyficzne – sekwencja produktu znacznie różniła się od sekwencji kodującej RBM10.

Dla dalszego potwierdzenia przeprowadzono również dodatkową analizę transkryptomu w celu identyfikacji formy dojrzałej mRNA. Ostatecznie obecność obu form transkryptów (z retencyjnym intronem i dojrzałej) potwierdzono dla THOC4, RS2Z32 oraz hnRNP Q-like isoform X, natomiast dla RBM39 wykryto jedynie formę z retencyjnym intronem.

Podsumowując, choć reakcja FISH nie dała oczekiwanych rezultatów dla dojrzałych form mRNA kodujących białka THOC4, RS2Z32 oraz hnRNP Q-like isoform X, pozostałe analizy molekularne potwierdziły ich współistnienie w komórkach mikrosporocytów. W przypadku tych transkryptów najprawdopodobniej zachodzi post-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, polegająca na czasowej retencji intronów w pre-mRNA. Dodatkowo różne wzorce ekspresji analizowanych transkryptów wspierają hipotezę o precyzyjnej regulacji czasu syntezy białek kluczowych dla różnicowania się komórek linii generatywnej.

Wyniki dotyczące pre-mRNA oraz mRNA RBM39 pozostawiają jednak pewne wątpliwości, które nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, czy to białko podlega podobnej regulacji. Aby rozwiązać te wątpliwości, konieczne jest przeprowadzenie głębszej analizy tego transkryptu.

Podsumowanie:

1. Przeprowadzone badania *in situ* potwierdziły obecność sekwencji intronowych we wszystkich badanych transkryptach. Wyniki zostały dodatkowo potwierdzone poprzez wykonanie reakcji qPCR, analizę długości produktu oraz jego sekwencjonowanie.
2. Formę dojrzałą obserwowano *in situ* dla mRNA kodującego białko RBM 39.
3. Negatywne wyniki reakcji przeprowadzonych dla pozostałych transkryptów, mogły wynikać z nieprawidłowego funkcjonowania sondy lub utrudnionej dostępności do docelowego miejsca wiązania dla stosowanej sondy. Pozostałe przeprowadzone analizy tj. qPCR, elektroforeza kapilarna oraz sekwencjonowanie, potwierdziły z kolei obecność dojrzałych form wszystkich transkryptów z wyjątkiem mRNA RBM39.

5.5 Zmiany w składzie molekularnym ciał Cajala podczas trwania cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

Ciała Cajala są domenami jądrowymi zaangażowanymi w przechowywanie jak i dojrzewanie małych jądrowych rybonukleoprotein (snRNP). Dodatkowo, w mikrosporocytach modrzewia, biorą udział w procesie retencji mRNA poprzez ich akumulację na swoim terenie oraz jak się wydaje, są kluczowe dla późniejszego ich uwolnienia do cytoplazmy (Rudzka i wsp. 2022). W trakcie trwania pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA, ciała Cajala zmieniają się pod względem zarówno różnych składników w nich występujących, jak i ich poziomu. Wcześniejsze badania wykazały przede wszystkim, że podczas trwania cyklu w CB zmienia się poziom poliadenylowanych transkryptów, jak również snRNA (Rudzka i wsp. 2022). Poli(A)RNA gromadzone były w CB od początku cyklu do stadium 4 (najwyższy poziom odnotowano w stadium 3), podczas gdy w stadium 5 w CB nie obserwowano nagromadzenia poli(A)RNA. W przypadku snRNA obserwowano stopniowy wzrost tych RNA zarówno na terenie nukleoplazmy jak i CB.

W tej pracy skupiono się na pokazaniu jak zmienia się skład molekularny ciał Cajala dostosowując ich funkcjonalność do kolejnych etapów cyklu.

5.5.1 Zmiany zawartości poszczególnych elementów tworzących U snRNP w CB podczas trwania cyklu syntezy i eksportu mRNA

Wcześniejsze badania wykazały, że poziom zarówno U2 snRNA (Rudzka i wsp. 2022) jak i pozostałych U snRNA (Wróblewska-Ankiewicz, dane niepublikowane) wzrasta stopniowo w trakcie trwania cyklu. W początkowych etapach cyklu U2 snRNA obserwowano głównie na terenie CB, ze względu na znacznie wyższą koncentrację tego RNA w CB w porównaniu do nukleoplazmy. Wraz z kolejnymi stadiami cyklu obserwowano stopniowy wzrost sygnału zarówno w nukleoplazmie, jak i w ciałach Cajala. Pod koniec cyklu intensywność sygnału była zwiększona około 4,5-krotnie w nukleoplazmie oraz aż 166,5-krotnie w ciałach Cajala. Analogiczne pomiary wykonano dla U4 snRNA. W tym przypadku w nukleoplazmie odnotowano wzrost 8,5-krotny, natomiast w ciałach Cajala – 7,5-krotny (Wróblewska-Ankiewicz, dane niepublikowane).

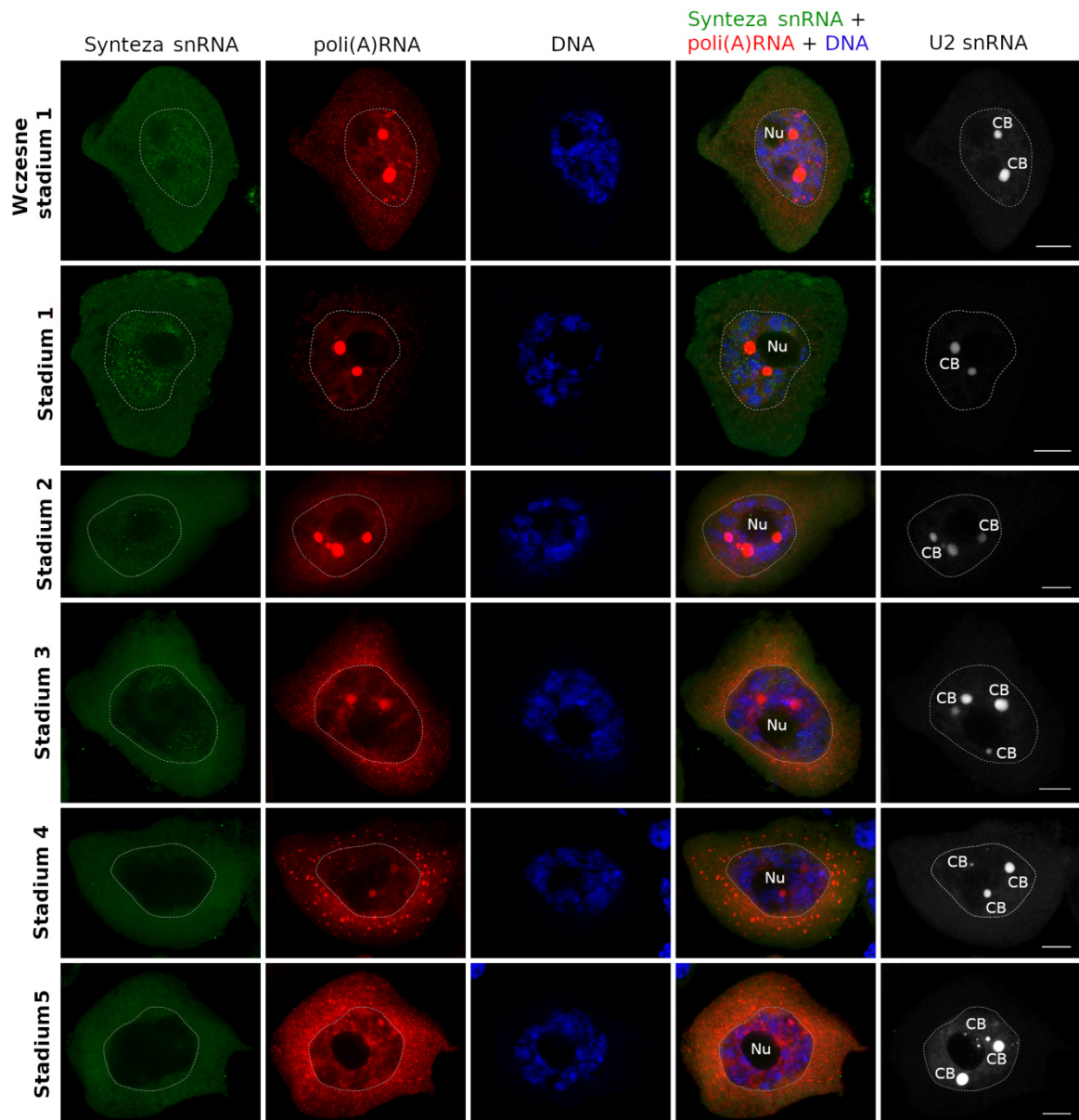
Na całkowitą pulę snRNA w mikrosporocytach modrzewia podczas trwania cyklu składa się: (1) pula nowo syntetyzowanych snRNA, (2) pula snRNA będąca składnikiem U snRNP, na różnych etapach montażu tego kompleksu, (3) snRNA będące składnikiem U snRNP biorących aktywny udział w splicingu. W niniejszej pracy podjęto próbę prześledzenia poszczególnych etapów powstawania kompleksów U snRNP oraz pokazania zaangażowania CB w poszczególne etapy tego procesu podczas pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.

5.5.1.1 Synteza U snRNA

Synteza snRNA przeprowadzana jest przez polimerazę RNA II, która posiada specyficzną modyfikację w obrębie swojej domeny CTD, unikalną dla transkrypcji snRNA. Domena CTD polimerazy RNA II, składająca się z powtórzeń sekwencji Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, jest poddawana różnorodnym modyfikacjom, z których kluczową dla syntezy snRNA jest fosforylacja Ser-7 w powtórzeniach heptapeptydowych CTD.

Modyfikacja ta jest niezbędna do skutecznej transkrypcji genów kodujących snRNA i odróżnia je od transkrypcji genów mRNA (Zaborowska i wsp. 2016).

Z tego względu do zbadania tego, kiedy dokładnie przebiega synteza snRNA przeprowadzono reakcję immunoznakowania z wykorzystaniem przeciwciała wykrywającego modyfikację seryny 7 w domenie CTD polimerazy RNA II. Wyniki tej reakcji wskazują, że synteza snRNA odbywa się głównie na początku cyklu poli(A)RNA tj. w stadium 1 oraz w mniejszym stopniu w stadium 2 i 3 (Ryc.33).



Ryc. 33 Synteza snRNA w cyklu poli(A)RNA. Intensywny, punktowy sygnał fluorescencyjny obserwowany jest głównie w stadium 1 na terenie jądra komórkowego, co sugeruje aktywną syntezę snRNA w tym etapie. W stadiach 2 oraz 3 widoczne są zaledwie pojedyncze punktowe sygnały, co może wskazywać na stopniowy spadek intensywności transkrypcyjnej. Pod koniec cyklu, tj. w stadium 4 oraz 5, nie zaobserwowano sygnału fluorescencji, co wskazuje na bardzo niski poziom lub całkowity brak syntezy snRNA na tym etapie. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μ m.

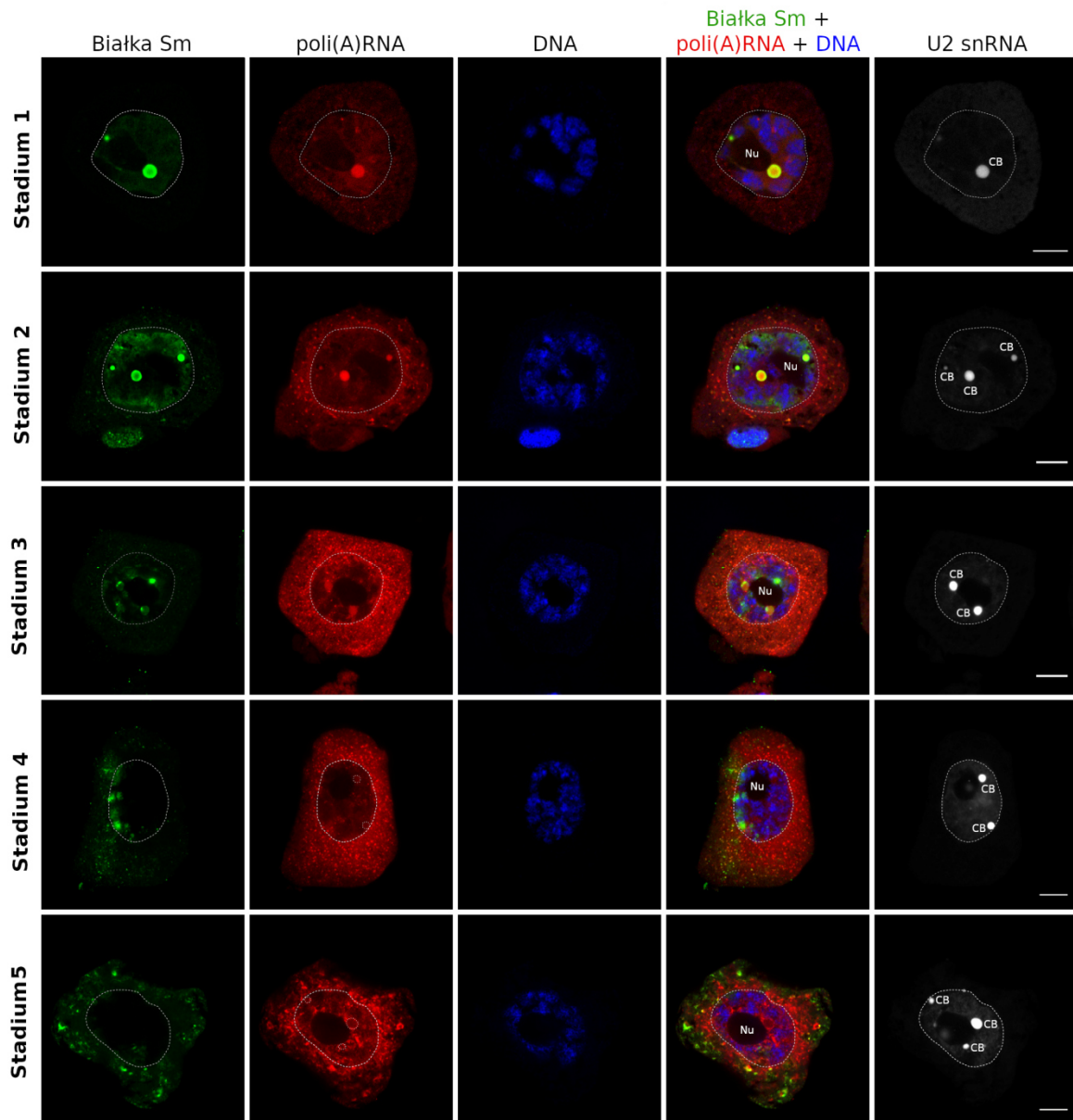
Obserwowane obniżenie sygnału w końcowych stadiach cyklu może sugerować, że snRNA przechodzi proces dojrzewania, jak również przyłączane są do niego białka tak, aby powstały funkcjonalne kompleksy U snRNP, których ostatecznym miejscem modyfikacji i przechowywania są ciała Cajala.

5.5.1.2 Dystrybucja białek Sm

Nowo syntetyzowane snRNA, po utworzeniu kompleksu eksportującego w ciałach Cajala, są transportowane do cytoplazmy, gdzie następuje dołączenie heptamerycznego pierścienia białek Sm. Białka Sm stanowią rdzeniowe komponenty kompleksów U snRNP. Przyłączenie pierścienia warunkuje następnie ponowny import snRNA do jądra komórkowego.

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę rozmieszczenia białek Sm w mikrosporocytach modrzewia w trakcie cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA, w celu prześledzenia dalszych losów kompleksów U snRNP.

W początkowych etapach cyklu białka Sm lokalizowane były głównie na terenie jądra komórkowego (stadia 1 - 3). Sygnał widoczny był głównie na terenie nukleoplazmy jak i ciał Cajala (Ryc.34). W tych stadiach na terenie cytoplazmy widoczne były nieliczne, pojedyncze skupiska sygnału. W stadium 4 białka Sm lokalizowane były na obrzeżach jąder, poza ciałami Cajala. Natomiast pula cytoplazmatyczna tych białek zwiększała się. W stadium 5 jądro mikrosporocytów było wolne od znakowania, w cytoplazmie widoczne były liczne drobne skupienia sygnału.



Ryc. 34 Rozmieszczenie białek Sm podczas cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Od stadium 1 do 3 białka Sm są obecne w jądrze komórkowym. Podczas stadium 4 oraz 5 białka Sm znajdują się głównie w cytoplazmie. Białka Sm (zielony), poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μm .

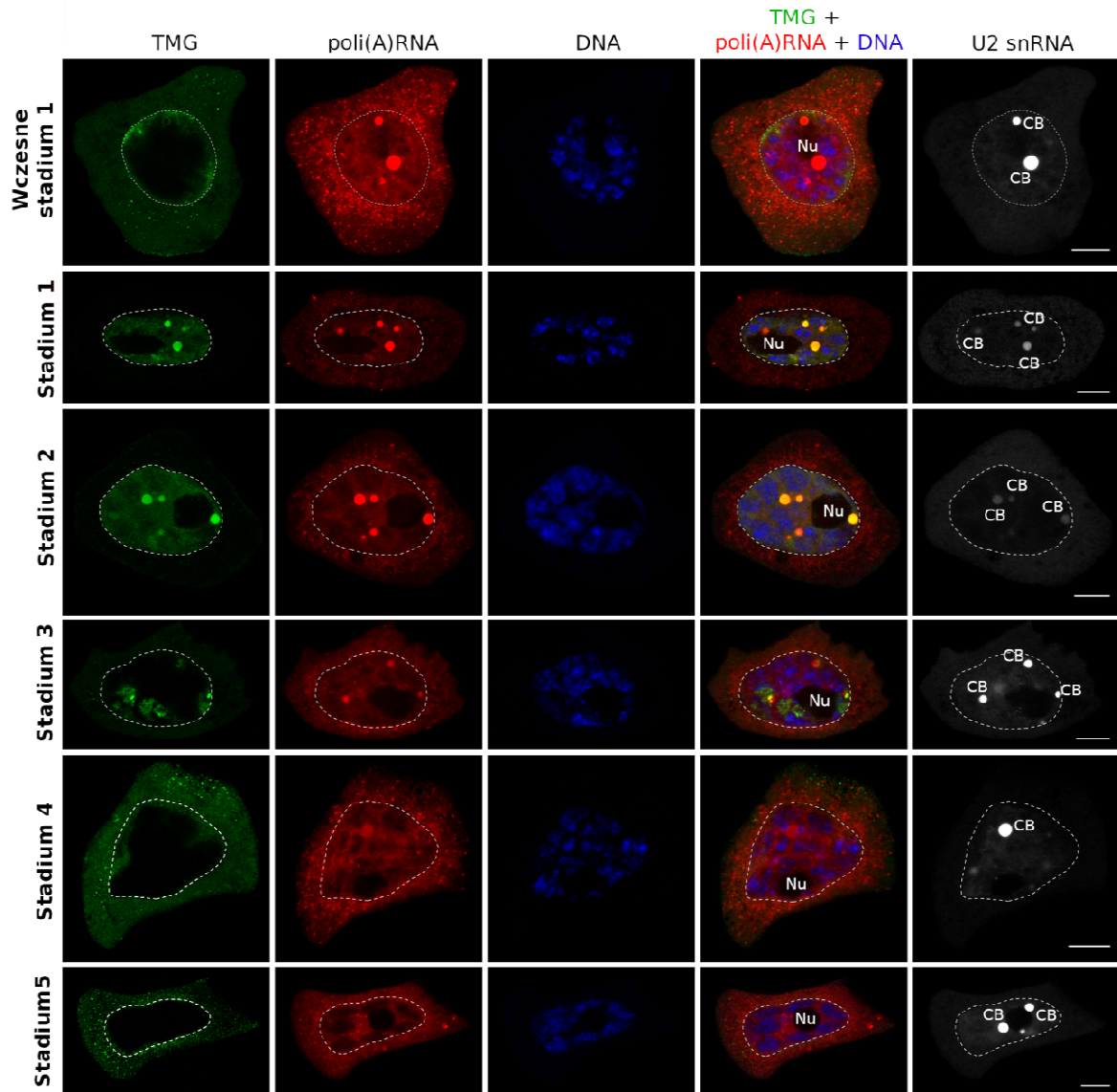
5.5.1.3 Dojrzewanie końca 5' U snRNA

Po przyłączeniu pierścienia białek Sm, U snRNP podlegają dalszym etapom dojrzewania. Należą do nich m.in. utworzenie czapeczki trimetyloguanozyny (TMG) na końcach 5' snRNA. Proces ten, znany jako hipermetylacja czapeczki, przeprowadzany jest przez enzym syntezę trimetyloguanozynową - TGS1. Enzym ten jest kluczowy dla stabilności i funkcji snRNA (Kataoka 2023). Proces ten odbywa się na terenie cytoplazmy, gdzie snRNA transportowane są z jądra po ich syntezie.

Aby prześledzić dalsze losy nowosyntetyzowanych snRNA, przeprowadzono reakcję immunoznakowania z zastosowaniem przeciwciała wykrywającego specyficzną dla snRNA modyfikację końca 5' (TMG) oraz oddzielnie dla przeciwciała wykrywającego enzym TGS1.

Dystrybucja TMG snRNP podczas cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

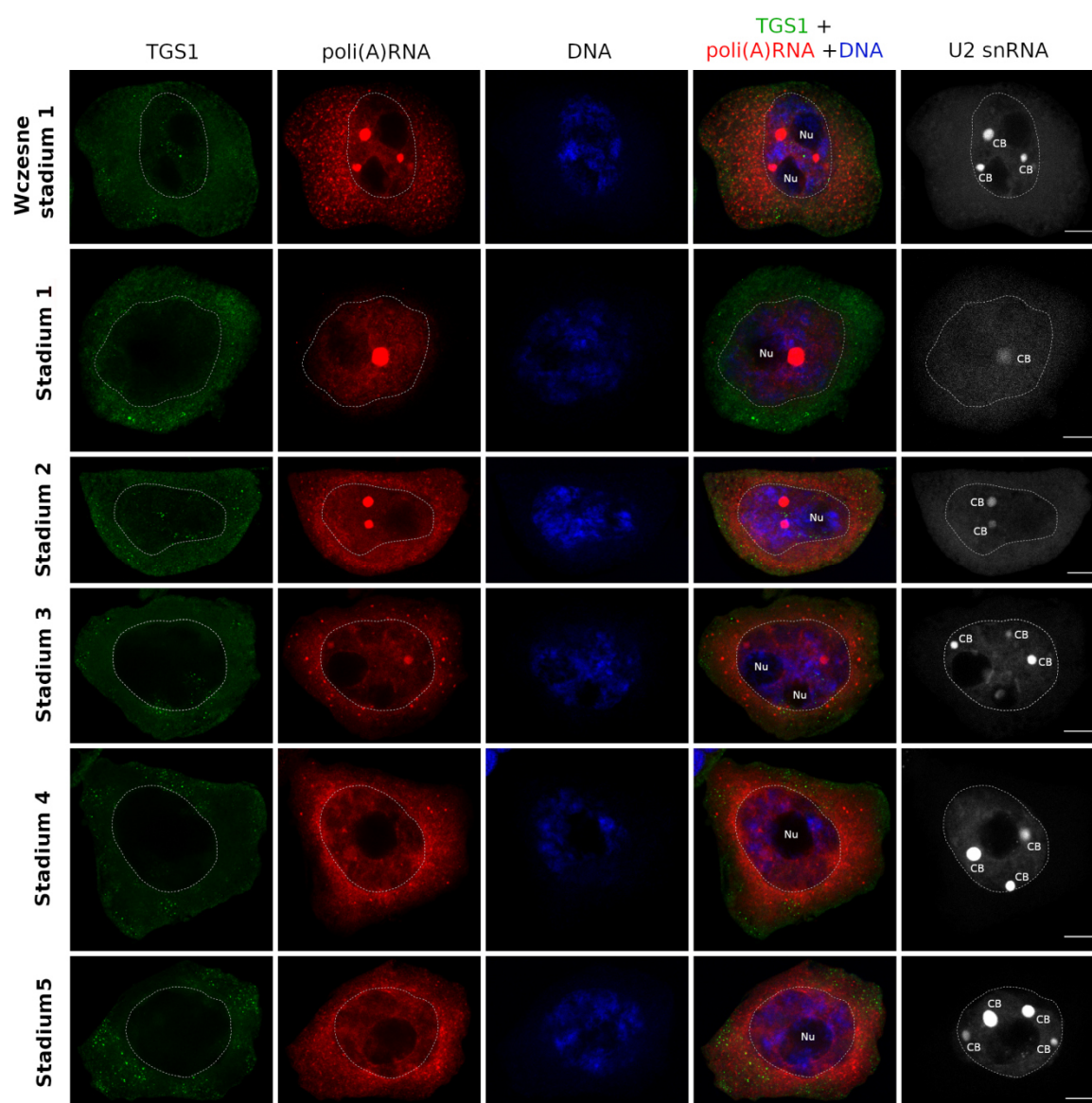
W bardzo wczesnych etapach cyklu (wczesne stadium 1) dojrzałe cząsteczki U snRNP z uformowaną czapeczką na 5' końcu, obecne były w mikrosporocytach modrzewia na terenie cytoplazmy, jak również sygnał widoczny był na obrzeżach jądra, jak i wokół niektórych ciał Cajala (Ryc.35). W stadium 1 i 2 dojrzałe U snRNP obecne były głównie w jądrze mikrosporocytów, zarówno w nukleoplazmie jak i w ciałach Cajala. W stadium 3 pula TMG snRNP zmniejsza się. Sygnał widoczny jest w pewnych obszarach nukleoplazmy, nie wypełnia jej jednak całkowicie jak w stadium 1 i 2. Znacznie mniej tych RNA jest również w CB, są one jedynie częściowo wypełnione. W 4 i 5 stadium jądra mikrosporocytów są praktycznie pozbawione sygnału pochodzącego od dojrzałych cząsteczek U snRNP, w cytoplazmie natomiast pula tych rybonukleoprotein znacząco wzrasta.



Ryc. 35 Lokalizacja U snRNP z modyfikacją końca 5' (czapeczką TMG) w cyklu poli(A)RNA. Modyfikacja końca 5' U snRNP następuje w stadiach 4 i 5, co objawia się punktowym sygnałem w cytoplazmie. Na początku cyklu widoczny jest powrót zmodyfikowanych cząsteczek U snRNP do jądra, gdzie kolejno gromadzą się w nukleoplazmie oraz ciałach Cajala (stadia 1 oraz 2). Od stadium 3 obserwuje się spadek ilości jądrowego sygnału – najprawdopodobniej jest to spowodowane degradacją puli wykorzystanych w procesie splicingu U snRNP. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB – ciało Cajala, Nu – jąderko. Skala – 10 μ m.

Lokalizacja TGS1 podczas trwania cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

W celu potwierdzenia wyników dotyczących momentu cytoplazmatycznej obróbki końca 5' U snRNP przeprowadzono dodatkową reakcję immunoznakowania z wykorzystaniem przeciwciała anti-TGS1. Od wczesnego stadium 1 do końca stadium 3 zaobserwowano punktowe sygnały obecne zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie. W stadiach 4 oraz 5 sygnał TGS1 obserwowany był już wyłącznie w cytoplazmie, a jego intensywność była wyższa niż w poprzednich stadiach (Ryc.36).

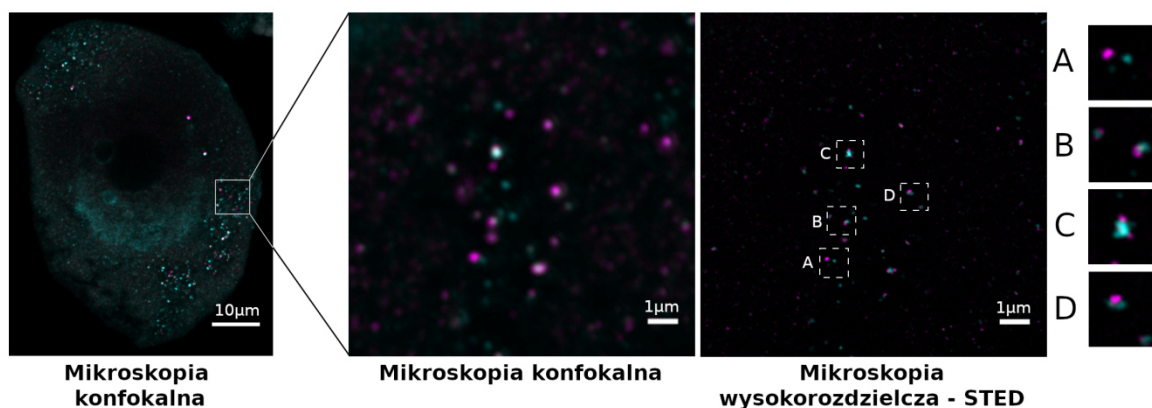


Ryc.36 Lokalizacja enzymu TGS1 w cyklu poli(A)RNA. Od wczesnego stadium 1 do końca stadium 3 widoczne są punktowe sygnały obecne zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie. W stadiach 4 oraz 5 sygnał TGS1 obecny jest wyłącznie w cytoplazmie, a jego intensywność jest wyższa niż w poprzednich stadiach. Poli(A)RNA (czerwony),

DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala – 10 μm .

Cytoplazmatyczna lokalizacja TMG oraz TGS1 – mikroskopia wysokorozdzielcza STED

Dodatkowym potwierdzeniem uzyskanych wyników dotyczących cytoplazmatycznego etapu dojrzewania cząsteczek U snRNP jest analiza przeprowadzona z wykorzystaniem reakcji wielokrotnego znakowania z użyciem przeciwciał anty-TMG oraz anty-TGS1. Do detekcji zastosowano wtórne przeciwciała sprzężone z fluoroforami STAR red i STAR orange (Abberior), dedykowanymi do wysokorozdzielczych technik mikroskopowych, takich jak STED, STORM czy SIM. Na rycinie 37 przedstawiono obrazy uzyskane za pomocą mikroskopii konfokalnej (po lewej) oraz mikroskopii wysokorozdzielczej STED (po prawej). Sygnały odpowiadające lokalizacji enzymu TGS1 oraz zmodyfikowanej czapeczki TMG występują w bardzo bliskim sąsiedztwie, co najprawdopodobniej odzwierciedla moment bezpośrednio następujący po modyfikacji końca 5' przez enzym TGS1.



Ryc. 37 Jednoczesna lokalizacja cząsteczek U snRNP zawierających czapeczkę TMG oraz enzymu TGS1 w stadium 1 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. Bliskie sąsiedztwo sygnałów odpowiadających enzymowi TGS1 (STAR red - magenta) oraz zmodyfikowanej czapeczce TMG (STAR orange - cyan) wskazuje na uchwycenie etapu bezpośrednio po modyfikacji końca 5' przez TGS1.

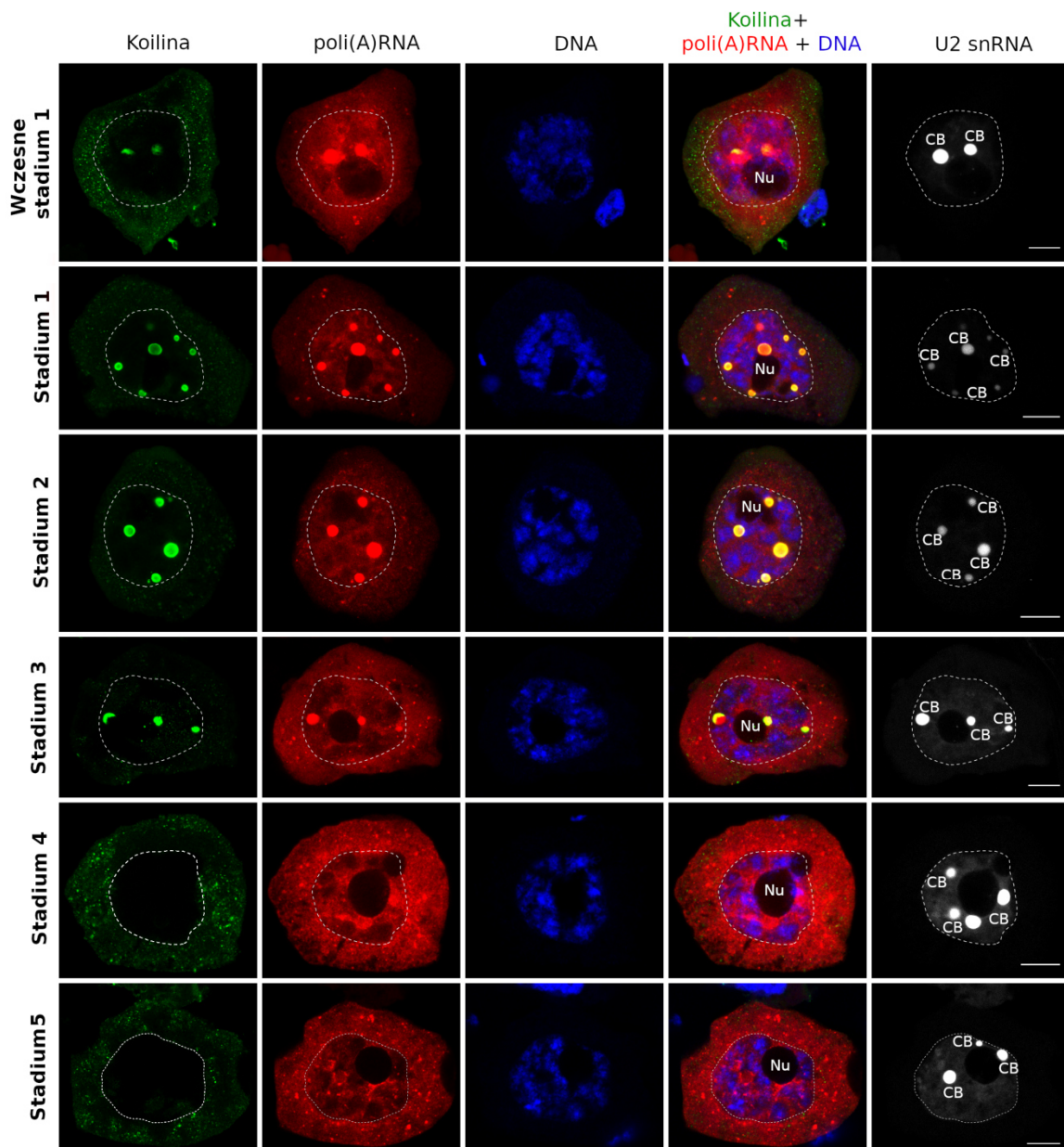
5.5.2 Koilina – element strukturalny CB istotny dla ich prawidłowego funkcjonowania w tym rekrutacji U snRNP

Integralność ciał Cajala, a w szczególności lokalizacja białka kolininy w ich obrębie, ściśle zależy od prawidłowego przebiegu biogenezy cząsteczek U snRNP (Lemm i wsp. 2006). W badaniach tych wykazano, że obniżenie poziomu białek uczestniczących w biogenezie U snRNP prowadzi do zaburzenia ich dojrzewania oraz uniemożliwia ich ponowny import do jądra komórkowego. W konsekwencji koilina ulega rozproszeniu w nukleoplazmie. Wyniki te jednoznacznie wskazują na istnienie funkcjonalnego związku pomiędzy obecnością dojrzałych cząsteczek U snRNP a lokalizacją kolininy w ciałach Cajala. Z kolei badania Tuckera i zespołu potwierdzają rolę kompleksu SMN w przekazywaniu nowo zaimportowanych U snRNP do kolininy w obrębie tych struktur (Tucker i wsp. 2001).

Powyższe doniesienia naukowe stały się impulsem do zbadania dystrybucji białka kolininy w mikrosporocytach modrzewia europejskiego. W badanym modelu obserwujemy bowiem nietypową pulsacyjną syntezę nie tylko poliadenyowanych transkryptów ale również U snRNA. Dodatkowo w pojedynczym cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA obserwujemy istotne zmiany w ilości tych cząsteczek na terenie CB.

Dzięki danym uzyskanym w wyniku sekwencjonowania transkryptomu mikrosporocytów, możliwe stało się zlecenie produkcji przeciwciał, które posłużyłyby do immunoznakowania koiliny w komórkach modrzewia europejskiego. Wykorzystując sekwencję nukleotydową kodującą fragment domeny Tudor, ustalono przewidywaną sekwencję aminokwasową fragmentu domeny Tudor u modrzewia europejskiego (Supl.27). Produkcję przeciwciała zlecono niemieckiej firmie Devids Biotechnologie. Przed przystąpieniem do reakcji immunoznakowania specyficzność wyprodukowanych przeciwciał zweryfikowano metodą Western blot. W wyniku tej analizy uzyskano prążek na poziomie 65 kDa, odpowiadający przewidywanej masie białka koiliny (Supl.28). Wynik ten potwierdził specyficzność działania przeciwciała.

We wczesnych etapach cyklu koilina obecna była w licznych skupieniach na terenie cytoplazmy mikrosporocytów (Ryc.38). W jądrze białko to było obecne w ciałach Cajala, częściowo je wypełniając. W późniejszych etapach, aż do stadium trzeciego koilina lokalizowała się głównie w CB. Większość ciał wypełniona była nierównomiernie. Często sygnał kotliny był bardziej intensywny na peryferiach ciała, w środku natomiast był słabszy. Obserwowane były również ciała z polarnym rozmieszczeniem tego białka, po jednej ze stron. W stadium 4 i 5 stadium koilina nie była obecna na terenie jądra komórkowego, sporo sygnału natomiast obserwowano w cytoplazmie.



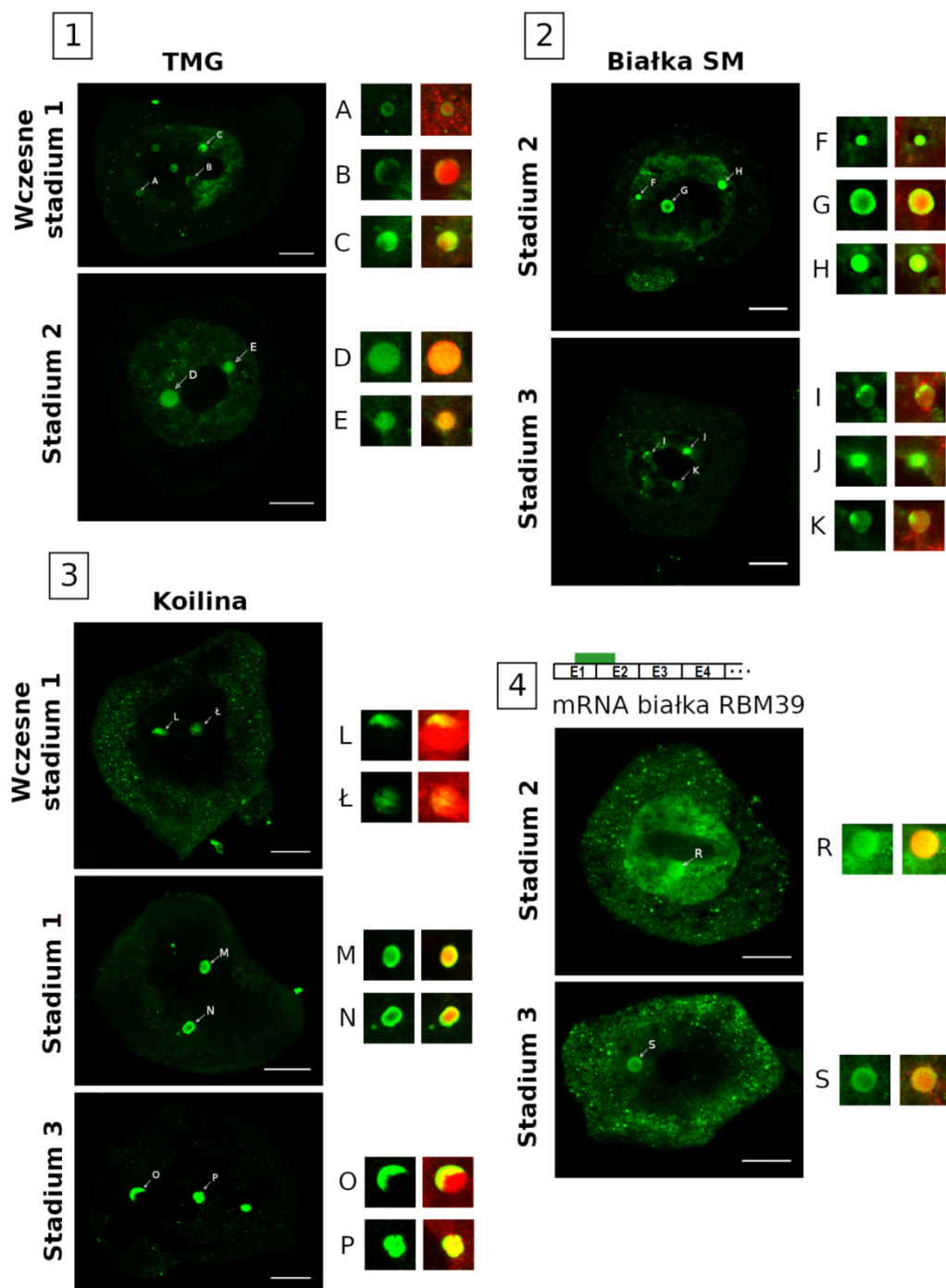
Ryc. 38 Lokalizacja koiliny w cyklu poli(A)RNA. Od początku cyklu do końca stadium 3 koilina występuje w ciałach Cajala, przy czym w stadium 3 obserwuje się jej stopniowe zanikanie w tych strukturach. Punktowy sygnał cytoplazmatyczny dla koiliny utrzymuje się przez cały cykl, osiągając największą intensywność w stadiach 4, 5 oraz we wczesnym stadium 1, co może wskazywać na wzmożoną syntezę tego białka tuż przed jego ponowną akumulacją w CB. Poli(A)RNA (czerwony), DNA (niebieski), U2 snRNA (biały). Granica między jądrem a cytoplazmą zaznaczona jest białą przerywaną linią. CB — ciało Cajala, Nu — jąderko. Skala — 10 μ m.

Podsumowanie:

1. Początek cyklu syntezy poli(A)RNA jest również momentem wzmożonej syntezy U snRNA. Wraz z następowaniem kolejnych stadiów ulega ona wyciszeniu.
2. Koniec cyklu jest momentem w którym dochodzi do modyfikacji końca 5' nowosyntetyzowanych U snRNA na terenie cytoplazmy. W wyniku hipermetylacji przez enzym TGS-1 na końcu 5' powstaje czapeczka TMG.
3. Po tych etapach dojrzewania, U snRNP ulegają akumulacji na terenie ciał Cajala. Ma to miejsce od wczesnego stadium 1 kolejnego cyklu do stadium 2. Na tym etapie dojrzałe U snRNP są najprawdopodobniej zużywane podczas intensywnie zachodzącego w tym czasie procesu splicingu.
4. Podczas trwania jednego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA lokalizacja białka koilina podlega dynamicznym zmianom. Od połowy cyklu do jego końca obserwuje się stopniowe zanikanie koiliny z obszaru ciała Cajala.
5. Pod koniec cyklu na terenie cytoplazmy dochodzi do syntezy koiliny *de novo*. Najprawdopodobniej pula nowosyntetyzowanych białek ulegnie następnie akumulacji w CB na początku trwania kolejnego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.

5.6 Organizacja przestrzenna ciał Cajala – strefowość występowania białek oraz RNA na terenie tych kondensatów

Podczas analizy obrazów uzyskanych w wyniku przeprowadzonych reakcji immunoznakowania oraz FISH, zwrócono również szczególną uwagę na strefową lokalizację niektórych białek czy RNA występujących na terenie ciał Cajala. Na poniższej rycinie (Ryc.39) przedstawiono przykłady specyficznej lokalizacji czapeczki TMG, białek Sm, białka koiliny, jak również dojrzałego mRNA białka RBM39 w obrębie omawianych kondensatów.



Ryc. 39 Strefowość występowania białek oraz RNA w ciałach Cajala.

1) Immunoznakowanie czapeczki TMG (zielony). We wczesnych etapach akumulacji UsnRNP (takich, które posiadają już czapeczkę TMG na końcu 5') w kondensatach, widoczna jest ich sferyczna lokalizacja, zarówno w mniejszych jak i większych CB (A,B,C). W stadium 2 cząsteczki te wypełniają CB równomiernie (D,E). 2) Immunoznakowanie białek Sm (zielony). W stadium 2 białka Sm lokalizują się głównie na peryferiach CB, tworząc sferyczny wzór, szczególnie widoczny w dużych CB (G). Mniejsze ciała mają

raczej równomierny rozkład białek Sm (F, H). W późniejszych stadiach obserwuje się zanik białek Sm – w niektórych ciałach są one wciąż obecne (J), w innych występują tylko lokalnie (I, K). 3) Immunoznakowanie białka koiliny (zielony). We wczesnym stadium 1 koilina jest obecna lokalnie w CB (L, Ł). W stadium 1 koilina wypełnia całą objętość CB, jednak z wyraźną tendencją do akumulacji na peryferiach (M, N). W stadium 3 obserwuje się strefowe zanikanie koiliny – białko pozostaje tylko w niektórych obszarach ciał, podczas gdy inne strefy są całkowicie pozbawione koiliny (O). Niektóre ciała nadal są wypełnione koiliną (P). 4) FISH dla mRNA białka RBM39 (zielony). W stadium 2 dojrzałe mRNA jest rozmieszczone równomiernie w CB (R). W stadium 3 transkrypt lokalizuje się sferycznie w obrębie CB (S). Poli(A)RNA (czerwony). Skala: 10 µm.

Analiza obrazów immunoznakowania czapeczki TMG wykazała, że we wczesnym stadium 1, cząsteczki U snRNP, które stopniowo akumulują się na terenie ciał Cajala, zajmują głównie obszar peryferyczny tych kondensatów (Ryc.39.1A,B,C). Dotyczy to zarówno większych jak i mniejszych CB. Natomiast w stadium 2 ich lokalizacja w tych strukturach jest bardziej jednorodna (Ryc.39.1D,E). Wyniki dotyczące białek Sm wykazały ich sferyczną lokalizację w obrębie ciał Cajala w stadium 2 (Ryc.39.2). Zjawisko to częściej obserwowano w większych ciałach (Ryc.39.2G), natomiast mniejsze kondensaty były równomiernie wypełnione w całej swojej objętości (Ryc.39.2F,H). W stadium 3 zaobserwowano stopniowe zanikanie białek Sm z obszaru CB. W większych strukturach białko obecne było lokalnie, na ograniczonych obszarach (Ryc. 39.2I,K), podczas gdy mniejsze ciała pozostawały całkowicie wypełnione białkami Sm (Ryc.39.2J). Obserwowane od trzeciego stadium stopniowe zanikanie z terenu CB białek Sm najprawdopodobniej związane jest ze zużywaniem cząsteczek U snRNP w intensywnie zachodzącym w tym czasie procesie splicingu. Ostatnim analizowanym białkiem była koilina. W tej części badania skupiono się na zmianach ilości oraz lokalizacji tego białka wyłącznie w obrębie kondensatów. We wczesnym stadium 1 zaobserwowano polarne występowanie koiliny w CB (Ryc.39.3L, Ł). Od stadium 2 białko to było obecne w całej objętości kondensatów, z wyraźną tendencją do akumulacji na ich obszarach peryferyjnych (Ryc.39.3M, N). W stadium 3 zaobserwowano natomiast dwie sytuacje: w części ciał koilina wypełniała je całkowicie (Ryc.39.3P), natomiast

w innych tylko częściowo. Widoczna była wyraźna strefowość jej rozmieszczenia – obszary z dużą koncentracją białka przeplatały się z regionami całkowicie pozbawionymi jego obecności (Ryc.39.30).

Na koniec ponownie przeanalizowano wyniki hybrydyzacji dotyczące dojrzałej formy mRNA białka RBM39, koncentrując się na jego lokalizacji w obrębie ciał Cajala. W stadium 2 transkrypt wykazywał równomierny rozkład w CB (Ryc.39.4R). Natomiast w stadium 3 obserwowano jego obecność w całej objętości ciała, z wyraźną tendencją do akumulacji na peryferiach kondensatu (Ryc.39.4S).

Podsumowanie:

1. W obrębie ciał Cajala można wyróżnić strefy różniące się składem białkowym oraz zawartością RNA.
2. Charakterystyczna sferyczna koncentracja białek i RNA w ciałach Cajala ulega dynamicznym zmianom w kolejnych stadiach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.

6. DYSKUSJA

6.1 W dyfuzyjnym stadium diplotenu: pulsacyjna aktywność transkrypcyjna oraz retencja nowosyntetyzowanych mRNA

Jądro komórki w diplotenie profazy I podziału meiotycznego charakteryzuje się obecnością wyraźnie skondensowanych chromosomów homologicznych, połączonych chiazmami, które tworzą biwalenty (Hillers i wsp. 2017). Jednakże, u wielu organizmów, w tym u ssaków (Cooper 2000), owadów (Tworzydło i wsp. 2017) czy niektórych roślin (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015; Colas i wsp. 2017; Owens i Molder 1971), we wczesnym diplotenie obserwuje się występowanie tzw. stadium dyfuzyjnego (stadium rozproszonego), w którym chromosomy częściowo dekondensują, przyjmując niemal interfazowy stan. Zmienność czasowa mejozy u różnych gatunków jest duża, a faza diplotenu może trwać od zaledwie kilkudziesięciu minut do nawet kilkudziesięciu lat, w zależności od gatunku i specyfiki cyklu życiowego. W przypadku organizmów, u których diploten trwa dłużej, przez większość czasu jądro jest w stadium dyfuzyjnym. Dopiero tuż przed podziałem następuje ponowna kondensacja chromosomów, rozpoczyna się diakineza i dochodzi do pęknięcia osłonki jądrowej (Viveiros i De La Fuente 2019).

W komórkach mikrosporocytów modrzewia europejskiego, gdzie diploten trwa kilka miesięcy, obserwuje się występowanie silnie zdekondensowanej chromatyny charakterystycznej dla opisywanego stadium dyfuzyjnego (Kołowerzo-Lubnau i wsp. 2015). W obliczu długotrwałego zatrzymania komórki w tej fazie, niezbędna staje się aktywacja genów, która możliwa jest dzięki dekondensacji chromatyny. Aktywność transkrypcyjna jest kluczowa nie tylko dla utrzymania podstawowego metabolizmu komórki, ale również dla produkcji białek niezbędnych dla prawidłowego przebiegu mejozy. Długi czas trwania diplotenu obserwowany w mikrosporocytach jest najprawdopodobniej adaptacją ewolucyjną, ściśle powiązaną z sezonowym cyklem rozwojowym modrzewia europejskiego.

Pomimo de kondensacji chromatyny, która ułatwia aktywację genów i inicjację transkrypcji, aktywność transkrypcyjna w mikrosporocytach nie przebiega w sposób ciągły. Obserwuje się okresy trwające około 2 dni, podczas których aktywność polimerazy RNA II jest znacząco obniżona (Ryc.13; Ryc.14). Następnie obserwowany jest gwałtowny wzrost aktywności transkrypcyjnej, utrzymujący się przez 8–9 dni (Ryc.14; Rudzka i wsp. 2022).

Zmienność czasowa procesu transkrypcji objawiająca się okresową produkcją nowo powstających cząsteczek mRNA, jest zjawiskiem powszechnie obserwowanym w różnych typach komórek, od bakterii po ssaki (Levine i wsp. 2013). Jak wykazano pulsacyjna transkrypcja została zidentyfikowana jako dominujący sposób ekspresji dla około 8000 różnych loci w genomie człowieka (Dar i wsp. 2012). Każdy puls składa się z serii transkryptów wytwarzanych w krótkim czasie i jest oddzielony od kolejnego okresem ciszy transkrypcyjnej. Jeden z przykładów pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej dotyczy ekspresji genu kodującego białko p53 w komórkach ssaczych. Istota pulsacyjnej aktywności genu kodującego to białko polega na cyklicznym włączaniu i wyłączaniu się tego czynnika transkrypcyjnego w odpowiedzi na stres (np. uszkodzenia DNA). Przełączanie aktywności tego genu generowane jest przez powtarzającą się aktywację sensora stresu (kinazy ATM) oraz wiele pętli negatywnego sprzężenia zwrotnego, które prowadzą do degradacji białka p53 i jego samoregulacji. Mechanizm ten zapewnia dynamiczną odpowiedź komórki na utrzymujące się uszkodzenia DNA (Batchelor i wsp. 2011).

Pulsacyjna aktywność transkrypcyjna wskazuje na złożoną regulację procesów transkrypcyjnych, która może wynikać z dynamicznych zmian w strukturze chromatyny (np. remodelowanie chromatyny), modulacji aktywności polimerazy RNA II (np. jej pauzowania), dostępności czynników transkrypcyjnych czy obecności pętli sprzężenia zwrotnego — zarówno dodatnich, jak i ujemnych (Chubb i wsp. 2006).

W przypadku mikrosporocytów modrzewia europejskiego wykazano okresowe zmiany morfologii chromatyny w kierunku jej kondensacji, co jak wykazano koreluje z przejściowym obniżeniem aktywności transkrypcyjnej (Kołowerzo-Lubnau

i wsp. 2015). Obserwacje te sugerują, że pulsacyjna natura transkrypcji w mikrosporocytach może być regulowana przez specyficzne mechanizmy epigenetyczne, które wymagają dalszych badań.

Pulsacyjna aktywność może zwiększać elastyczność regulacyjną w podejmowaniu decyzji o ekspresji genów dzięki niezależnemu kontrolowaniu czasu trwania i amplitudy impulsów. Jednym z najlepiej udokumentowanych przykładów wpływu dynamiki transkrypcyjnej na odpowiedź komórkową jest supresor nowotworowy p53. Zarówno promieniowanie γ , jak i ultrafioletowe (UV) aktywują p53, ale skutkują odmiennymi odpowiedziami komórkowymi: w przypadku promieniowania γ dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego, a w przypadku UV — do apoptozy. Odpowiedzi te są związane z odmienną dynamiką aktywacji p53: promieniowanie γ indukuje serię impulsów, których liczba zależy od dawki, natomiast UV wywołuje niepulsacyjną, ciągłą odpowiedź o zmiennej amplitudzie i czasie trwania (Levine i wsp. 2013). W ten sposób pulsacyjna dynamika wyłania się jako centralna, a nadal w dużej mierze niezbadana, warstwa czasowej organizacji w komórce. Cykliczny wzrost aktywności transkrypcyjnej obserwowany w mikrosporocytach modrzewia może zatem odgrywać istotną rolę w dalszym rozwoju komórki — w tym w prawidłowym przebiegu podziału komórkowego prowadzącego do powstania dojrzałej, funkcjonalnej mikrospory.

Wykazano również, że z perspektywy funkcjonalnej, pulsacyjna, a nie ciągła transkrypcja, może przynosić komórce istotne korzyści, umożliwiając bardziej czułą i elastyczną kontrolę ekspresji genów. Dzięki pulsowaniu, komórka zyskuje większą zdolność do podejmowania decyzji transkrypcyjnych — nie musi się od razu „zobowiązywać” do pełnej realizacji programu ekspresji, ponieważ nie syntetyzuje całego wymaganego RNA w jednym impulsie (Chubb i wsp. 2006).

W kontekście uzyskanych w niniejszej pracy wyników dotyczących mikrosporocytów modrzewia europejskiego, obserwowane pulsy transkrypcyjne mogą być interpretowane nie tylko jako element regulacyjny, lecz również jako strategia adaptacyjna umożliwiająca ograniczenie kosztów energetycznych w fazach o zwiększonym zapotrzebowaniu biosyntetycznym, np. bezpośrednio przed podziałami

meiotycznymi. Strategia ta opiera się na optymalizacji zużycia energii poprzez ograniczenie czasu trwania aktywności transkrypcyjnej do kluczowych momentów, zamiast utrzymywania jej na stałym poziomie.

Badania obejmujące analizę transkryptomów i proteomów trzech różnych organizmów wykazały, że geny wykazujące pulsacyjną (cykliczną) ekspresję są związane z wyższymi kosztami energetycznymi, zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji. Geny niecykliczne okazały się statystycznie mniej kosztowne w syntezie (Wang i wsp. 2015). Pulsacyjna ekspresja może więc stanowić mechanizm oszczędności energetycznej, szczególnie istotny dla genów energochłonnych, które — zamiast być stale aktywne — są włączane okresowo, z dużą intensywnością (czyli o wysokiej amplitudzie), lecz na krótko. Pozwala to komórce osiągnąć wymagany poziom ekspresji przy znacznym ograniczeniu całkowitego zużycia ATP (Wang i wsp. 2015).

Czas trwania pulsów transkrypcyjnych może istotnie różnić się w zależności od rodzaju komórki i organizmu. W większości dotychczas opisanych przypadków aktywności pulsacyjnej, czas pomiędzy kolejnymi impulsami mieści się w zakresie od kilku minut do kilku godzin (Chubb i wsp. 2006; Zhao i wsp. 2016). Takie zjawiska zostały zaobserwowane m.in. w różnych układach ssaczych (Dar i wsp. 2012; Suter i wsp. 2011). Na tym tle szczególnie interesująco wypadają wyniki uzyskane dla mikrosporocytów modrzewia europejskiego, gdzie czas pomiędzy kolejnymi fazami aktywności transkrypcyjnej jest znacznie dłuższy — okres braku aktywności może wynosić nawet około 2 dni. Nie można wykluczyć, że tak długie przerwy pomiędzy impulsami transkrypcyjnymi mogą wynikać ze spowolnionego metabolizmu komórek, które w stadium dyfuzyjnym diplotenu pozostają w stanie fizjologicznego „uśpienia”, trwającym do momentu, w którym możliwe stanie się dokończenie mejozy. Hipotezę tę wspiera fakt, że w opisywanym modelu pulsacyjna aktywność transkrypcyjna dotyczy globalnie całego genomu, a nie wybranych, specyficznych genów. Obserwowano bowiem znaczący spadek poziomu aktywnej formy polimerazy RNA II, co sugeruje ogólne zahamowanie transkrypcji, a nie zmianę ekspresji ograniczoną do pojedynczych genów o cyklicznym charakterze. Warto zaznaczyć, że większość wcześniejszych badań dotyczących pulsacyjnej transkrypcji koncentrowała

się na aktywności pojedynczych, ściśle określonych genów, w przypadku których okresy aktywności jednego genu mogą się pokrywać z okresami braku aktywności innych genów, maskując w ten sposób globalny charakter zjawiska pulsacyjności (Chubb i wsp. 2006).

6.2 Różnicowana dynamika eksportu mRNA

W badanych komórkach, poza pulsacyjną aktywnością transkrypcyjną, zaobserwowano globalną retencję poliadenylowanych RNA (poli(A)RNA). Akumulują się one w nukleoplazmie oraz ciałach Cajala (CB) (Ryc.13). Okres retencji oraz ograniczenia eksportu większości mRNA jest stosunkowo długi, trwa od około 8 do 9 dni (Ryc.13). Dopiero po spadku aktywności transkrypcyjnej, czyli w stadium 2 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA (po 8-9 dniach), następuje stopniowe zapoczątkowanie eksportu mRNA z jądra do cytoplazmy. Co ciekawe, szczegółowa analiza poszczególnych mRNA ujawniła, że dynamika ich eksportu może się różnić. Na tej podstawie zidentyfikowano i opisano różne wzorce syntezy i eksportu mRNA. Różniły się one zarówno długością czasu przebywania transkryptów w jądrze, jak i momentem zainicjowania ich eksportu do cytoplazmy (Ryc. 15; Ryc. 16; Ryc.17; Ryc.18). Ta odmienna dynamika eksportu poszczególnych mRNA może służyć precyzyjnej kontroli czasowej syntezy kodowanych przez nie białek. W zależności od zapotrzebowania komórki na dane białko, jego synteza oraz może być ciągła i utrzymywać się na stałym poziomie, bądź też może być ograniczona tylko do określonych przedziałów czasowych – na przykład tuż przed momentem, gdy białko to będzie niezbędne w danym procesie komórkowym. Dodatkowym potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki wskazujące, że eksport mRNA do cytoplazmy poprzedza lub pokrywa się z momentem syntezy kodowanego przez nie białka (Ryc.17B; Ryc. 19C; Ryc.22).

Zjawisko retencji mRNA towarzyszące obniżonej aktywności transkrypcyjnej jest powszechnie obserwowane zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych, zwłaszcza w okresach intensywnych zmian morfogenetycznych. Przykładem mogą być badania przeprowadzone na mikrosporach paproci wodnej *Marsilea vestita*, które wykazały, że w fazie dojrzewania – charakteryzującej się odwodnieniem mikrospor

i ich przejściem w stan spoczynku – kluczowe mRNA oraz białka niezbędne do dalszego rozwoju są magazynowane w MLO typu *nuclear speckles* (NS). Co istotne, mikrospory w tym stadium stają się transkrypcyjnie nieaktywne i pozostają w tym stanie przez cały proces spermatogenezy, również po ich ponownym nawodnieniu. Regulowana translacja wcześniej zmagazynowanego mRNA w męskim gametoficie paproci okazuje się być niezbędna dla szybkiej produkcji funkcjonalnych, ruchliwych plemników. Akumulacja transkryptów w zarodniku, umożliwiającą ich długoterminowe przechowywanie, stanowi istotny mechanizm wspierający dynamiczne przejście do dojrzałych form gamet męskich (Boothby i Wolniak 2011). Podobne zjawisko zaobserwowano również w komórkach rozrodczych ssaków. W przypadku mysich spermatocytów wykazano wyraźnie wyższy poziom jądrowej retencji transkryptów w porównaniu do bardziej zaawansowanych rozwojowo spermatyd. Co istotne, wiele spośród retencyjnych mRNA pochodziło z genów odgrywających kluczową rolę w procesach związanych z funkcjonowaniem gamet. Badania te wykazały ponadto, że transkrypty te, mimo retencji w jądrze komórkowym, są stabilne i podlegają późniejszej translacji – zostają rekrutowane na polisomy dopiero po kilku dniach od momentu ich syntezy. Spermatocyty i spermatydy wymagają szczególnie intensywnego przeprogramowania ekspresji genów, co jest niezbędne do przejścia z mitozy do mejozy oraz do prawidłowego przebiegu morfogenezy gamet. Odkrycia te ujawniają nieoczekiwaną, istotną rolę regulowanej retencji transkryptów w precyzyjnym sterowaniu czasem ekspresji wybranych mRNA podczas spermatogenezy (Naro i wsp. 2017).

Nie można wykluczyć, że również w przypadku mikrosporocytów modrzewia obserwowana globalna retencja poli(A)RNA, współwystępująca z pulsacyjną aktywnością transkrypcyjną, odgrywa istotną rolę w procesie prawidłowego formowania się dojrzałych mikrospor.

Co więcej obserwowana retencja poli(A)RNA, jak i regulowany eksport mRNA mogą odgrywać również kluczową rolę w redukcji szumu transkrypcyjnego. Szum transkrypcyjny definiowany jest jako losowe fluktuacje w aktywności genów oraz poziomie transkryptów w czasie, co bezpośrednio wpływa na ilości syntetyzowanych

białek i może negatywnie oddziaływać na funkcjonowanie komórki. Zjawisko to wynika z niestabilnej kinetyki procesów molekularnych napędzających transkrypcję, które nie zachodzą w sposób ciągły z tą samą częstością. Prowadzi to do powstawania wspomnianych już impulsów transkrypcyjnych i, w konsekwencji, do czasowych fluktuacji aktywności genów. W sprzyjających warunkach powstały szum jest skutecznie tłumiony przez komórkę, co zapewnia powtarzalność i przewidywalność zmian rozwojowych. Należy jednak pamiętać, że w pewnych sytuacjach komórki mogą wykorzystywać szum transkrypcyjny do generowania zróżnicowania funkcjonalnego w obrębie populacji komórek (Urban i Johnston 2018).

W mikrosporocytach pulsacyjna aktywność transkrypcyjna generuje znaczne ryzyko występowania szumu transkrypcyjnego, potęgowane przez wyjątkowo długie, bo około dwudniowe, okresy nieaktywności. W takiej sytuacji, bez odpowiednich mechanizmów, całkowity brak dostępności do mRNA mógłby uniemożliwić komórce syntetyzowanie niezbędnych białek w wymaganym czasie. Dodatkowo, dojrzałe mRNA po eksporcie do cytoplazmy staje się wysoce podatne na degradację, co znacząco skraca jego żywotność w tym kompartmentcie (Schoenberg i Maquat 2012). W obliczu tych wyzwań, mechanizmy takie jak retencja poli(A)RNA i regulowany eksport mRNA jawią się jako kluczowe adaptacje. Umożliwiają one komórce efektywne zarządzanie pulą transkryptów w odpowiedzi na dynamiczne zmiany w ekspresji genów. Przypuszczalnie, dzięki retencji transkryptów i precyzyjnie kontrolowanemu eksportowi dojrzałych mRNA, komórka stopniowo uwalnia je z jądra do cytoplazmy. Proces ten jest zsynchronizowany z rosnącym zapotrzebowaniem na konkretne białka, minimalizując tym samym opóźnienie między eksportem mRNA a inicjacją syntezy białka.

Podsumowując, opisane zjawiska mogą służyć stabilizacji cytoplazmatycznego poziomu określonych mRNA. Ma to na celu umożliwienie nieprzerwanej syntezy białek nawet w okresach bardzo niskiej aktywności transkrypcyjnej. W ten sposób zapobiega się fluktuacjom w poziomie białek, których obecność w komórce musi być utrzymana na stałym poziomie. Komórka, niezdolna do syntezy nowych mRNA w danym momencie, może wówczas korzystać z rezerwuaru transkryptów zgromadzonego wcześniej w jądrze.

6.3 Ciała Cajala jako miejsca akumulacji niedojrzałych form mRNA oraz funkcjonalność transkryptów retencyjnych

Analiza stopnia dojrzałości retencyjnych transkryptów w mikrosporocytach modrzewia wykazała, że znaczna część mRNA zatrzymywanych w jądrze to transkrypty zawierające jeden lub kilka niewyciętych intronów (Ryc.20; Ryc.24; Ryc.26; Ryc.28; Ryc.30; Ryc.32). Niedojrzałe mRNA, które nie przeszły kompletnego splicing, akumulują się zarówno w ciałach Cajala, jak i w nukleoplazmie. Z kolei dojrzałe formy analizowanych transkryptów lokalizują się głównie w nukleoplazmie we wczesnych stadiach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA oraz w cytoplazmie – głównie pod koniec cyklu.

Dodatkowo wykazano, że pre-mRNA kodujące różne białka współwystępują w obrębie wyżej wymienionych kompartmentów w tym samym czasie (Ryc.21). Potwierdzenie tego założenia było możliwe dzięki opracowaniu techniki multi-indirect FISH, polegającej na całkowitym wysyceniu miejsc wiązania przeciwciała wtórnego z przeciwciałem pierwotnym, eliminując w ten sposób ryzyko krzyżowego wiązania, które mogłoby prowadzić do uzyskania fałszywie dodatnich wyników.

Wyniki te jednoznacznie wskazują na zaangażowanie ciał Cajala w retencję niedojrzałych transkryptów w jądrze. Dodatkowo obserwacje wykazały, że dojrzałe mRNA obecne w nukleoplazmie mogą ulegać akumulacji w pobliżu CB (*ang. Cajal body*), co prowadzi do hipotezy, że splicing retencyjnych intronów zachodzi bezpośrednio po uwolnieniu transkryptu z ciała Cajala i tuż przed jego eksportem do cytoplazmy. Założenie to zostało potwierdzone ilościowo, metodą bezwzględnego qPCR (Rudzka i wsp. 2022).

Co istotne, w przypadku analizowanych w pierwszej kolejności transkryptów tj. kodujących białka Sm (Rudzka i wsp. 2022; Ryc.22) oraz podjednostkę RPB10 moment pojawienia się mRNA w cytoplazmie pokrywał się z czasem syntezy kodowanych przez nie białek (Ryc. 19). Potwierdzają to wyniki analizy ilości cytoplazmatycznej puli białek Sm w trakcie trwania cyklu (Rudzka 2020).

Gwałtownemu wzrostowi poziomu białek Sm w cytoplazmie pod koniec cyklu towarzyszył spadek ilości pre-mRNA w ciałach Cajala oraz wzrost ich obecności w cytoplazmie (Rudzka i wsp. 2022). Wyniki te sugerują, że transport mRNA do cytoplazmy jest skorelowany z ich translacją. Dodatkowo analiza proteomu cytoplazmatycznego mikrosporocytów wykazała, że białka Sm obecne są jedynie w stadiach 4 i 5, natomiast niema ich w komórkach w stadium 2 i 3 (Rudzka i wsp. 2022).

Na tej podstawie można wysunąć hipotezę, że retencyjne formy pre-mRNA w mikrosporocytach modrzewia pełnią funkcję regulacyjną, kontrolując czas eksportu mRNA, a tym samym czas syntezy konkretnych białek. W szczególności, późna translacja białek Sm mogłaby zapewniać dostępność splicingowych czynników tuż przed rozpoczęciem kolejnej fazy cyklu, w której aktywność transkrypcyjna wzrasta. Podobny mechanizm może dotyczyć mRNA kodującego RPB10 – retencja jego pre-mRNA może oddzielać czas transkrypcji od translacji, co pozwala komórce na zintensyfikowanie produkcji białka w okresie największego zapotrzebowania. Należy podkreślić, że pod koniec cyklu aktywność transkrypcyjna mikrosporocytów jest silnie obniżona, co ogranicza możliwość syntezy nowych mRNA. W takich warunkach wykorzystanie wcześniej zsyntetyzowanych i retencionowanych transkryptów pozwala na utrzymanie wydajnej translacji. Jednocześnie retencja mRNA w jądrze chroni komórkę przed niepotrzebną syntezą białka w okresach niskiego zapotrzebowania, np. pomiędzy „pulsami” transkrypcji.

Retencja transkryptów zawierających niewycięte sekwencje intronowe jest zjawiskiem powszechnie obserwowanym zarówno w komórkach roślin, jak i zwierząt. U wspomnianej już paproci wodnej *Marsilea vestita* wykazano, że część retencyjnych mRNA zawiera introny, które są usuwane w odpowiednich momentach rozwoju gametofitu, co umożliwia translację dojrzałych transkryptów (Boothby i wsp. 2013). Co istotne, w przypadku wysuszonych mikrospor tego gatunku, pre-mRNA zmagazynowane w jądrze mogą przetrwać w stanie nieprzetworzonym nawet przez kilka lat. Ponadto, u *M. vestita* stwierdzono, że retencyjne introny w różnych pre-mRNA ulegają post-transkrypcyjnemu splicingowi w różnym czasie, co odzwierciedla złożony i precyzyjny mechanizm regulacji ekspresji genów. Podobne zjawisko zaobserwowano

w mikrosporocytach modrzewia, gdzie wykazano zanik form intronowych analizowanych pre-mRNA w różnych stadiach cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA (Ryc.26; Ryc.28; Ryc.30; Ryc.32). Wyniki te sugerują istnienie dodatkowego poziomu regulacji, który odpowiada za czasowe usuwanie wybranych intronów. Podobne zjawisko zostało już wcześniej opisane w literaturze. Zgodnie z propozycją Boothby i wsp. (2013) istnieją dwa możliwe scenariusze wyjaśniające mechanizm kontrolujący czas usunięcia intronów retencyjnych. Pierwszy scenariusz zakłada, że w obrębie intronu znajdują się specyficzne sekwencje lub struktury, które mogą oddziaływać z czasowo regulowanymi czynnikami splicingowymi. Taki regulator może zostać aktywowany lub uwolniony z inhibicji w określonym momencie, co umożliwia mu rozpoznanie i zainicjowanie splicingu wybranych retencyjnych intronów posiadających odpowiednie motywy sekwencyjne. Dzięki obecności różnych sekwencji sygnałowych oraz kilku niezależnych regulatorów czasowych, komórka mogłaby zyskać możliwość selektywnego wycinania określonych podzbiorów retencyjnych intronów w różnym czasie. Drugi scenariusz zakłada, że komórka dysponuje pełnym potencjałem do wycinania wszystkich RI (*ang. retained intron*) jednak same transkrypty z retencyjnymi intronami pozostają początkowo „zamaskowane” lub z innych względów niedostępne dla maszynerii splicingowej. Odmaskowanie wybranego podzbioru retencyjnych intronów mogłoby czynić je dostępnymi do splicingu. Czasowa regulacja tego procesu odmaskowywania sprawiała by, że różne podzbiory retencyjnych intronów mogłyby być usuwane w określonych momentach rozwoju (Boothby i wsp. 2013). Mechanizm kontrolujący moment splicingu określonej grupy pre-mRNA oraz dokładne miejsce jego zachodzenia w mikrosporocytach modrzewia pozostają jednak na obecnym etapie badań nieznane i wymagają dalszych szczegółowych analiz.

Badania przeprowadzone na komórkach wątroby i jelita myszy (Bahar Halpern i wsp. 2015), a także na ludzkich komórkach linii HEK293T (Khyzha i wsp. 2025), również wykazały akumulację retencyjnych transkryptów jednak w obrębie innych jądrowych domen tj. nuclear speckles. Autorzy tych prac sugerują, że preferencyjne wiązanie mRNA w NS może ułatwiać ich zatrzymanie w jądrze komórkowym. Mimo to dokładna rola tych MLO w procesie retencji pozostaje nadal niewyjaśniona. Co istotne, zespół

Khyzha wykazał, że transkrypty obecne w NS również posiadają retencyjne introny. Dzięki zastosowaniu inhibicji splicingu dowiedziono, że niekompletnie splicingowane transkrypty są kierowane do NS, co wzmacnia hipotezę, iż są one miejscem post-transkrypcyjnego splicingu. Badacze zasugerowali również, że ukończenie splicingu w NS jest warunkiem koniecznym do uzyskania kompetencji do eksportu jądrowego. Tym samym wskazują, że nuclear speckles pełnią rolę punktów kontroli jakości, tymczasowo przechowując transkrypty do momentu zakończenia ich dojrzewania. W przypadku modrzewia europejskiego kondensatami, w obrębie których obserwuje się akumulację retencyjnych transkryptów, są ciała Cajala. Choć NS występują również w komórkach roślinnych to w mikrosporocytach modrzewia są one słabiej zorganizowane niż w komórkach zwierzęcych. Badania wykazały, że białko markerowe tych struktur, tj. SC35, gromadzi się w nukleoplazmie głównie w postaci dużych, nieregularnych obszarów zlokalizowanych na granicy jądra komórkowego, które odpowiadają nuclear speckles (Kołowerzo i wsp. 2009). Ze względu na zaobserwowany udział ciał Cajala w retencji pre-mRNA oraz nagromadzenie dojrzałych form mRNA wokół tych kondensatów można przypuszczać, że ciała Cajala w mikrosporocytach modrzewia przejęły pewne funkcje NS typowych dla komórek zwierzęcych i podobnie jak one pełnią rolę swoistych centrów kontroli jakości transkryptów.

Chociaż obecnie nie ustalono jeszcze, co dokładnie stanowi sygnał kierujący transkrypty do ciał Cajala, można przypuszczać, że istotną rolę w tym procesie odgrywa obecność sekwencji intronowych. Przypuszczenie to znajduje potwierdzenie w dotychczasowych obserwacjach, zgodnie z którymi w ciałach Cajala gromadzą się przede wszystkim transkrypty w formie z intronem, natomiast dojrzałe formy mRNA lokalizują się głównie w nukleoplazmie i zazwyczaj nie występują w CB. Potencjalnym sygnałem kierującym transkrypt do CB mogłaby być specyficzna sekwencja nukleotydowa obecna w retencyjnych intronach. Nie można również wykluczyć, że rolę takiego sygnału pełnią określone białka, które wiążąc się z retencyjnymi intronami, pośredniczą w transporcie transkryptów do ciał Cajala. Dokładny mechanizm prowadzący do akumulacji retencyjnych transkryptów w obrębie CB pozostaje jednak wciąż nieznany i wymaga dalszych badań.

W przeprowadzonych badaniach możliwa była szczegółowa identyfikacja transkryptów zawierających retencyjne introny, które ostatecznie ulegają post-transkrypcyjnemu splicingowi. Umożliwiła to izolacja frakcji komórek z różnych etapów cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA oraz przygotowanie osobnych transkryptomów dla każdej frakcji. Kluczowe znaczenie miało porównawcze mapowanie tych transkryptomów względem siebie, co pozwoliło prześledzić losy konkretnych pre-mRNA. Jednym z głównych kryteriów kwalifikacji transkryptu do bazy pre-mRNA z retencyjnymi intronami była obecność zarówno formy z intronem, jak i formy pozbawionej tego intronu w przynajmniej jednej z prób. Transkrypty, dla których nie wykryto formy po wycięciu intronu, zostały wykluczone. Dzięki temu baza obejmowała jedynie takie pre-mRNA, z których ostatecznie powstaje dojrzały, funkcjonalny transkrypt. Odrzucone transkrypty tj. takie, które zawsze zawierały intron i dla których nie zidentyfikowano formy bez intronu mogą pełnić inne funkcje w komórce np. służyć do syntezy alternatywnych izoform białkowych lub ulegać degradacji na drodze NMD, stąd też nie były one przedmiotem dalszych analiz w tej pracy.

Na dalszym etapie badań przeprowadzono szczegółową analizę stopnia dojrzałości transkryptów kodujących białka zaangażowane w proces splicingu oraz eksportu mRNA. Białka te pełnią m.in. kluczową rolę w regulacji dojrzewania pre-mRNA, co czyni je istotnym obiektem badań nad dynamiką splicingu w różnych warunkach aktywności transkrypcyjnej. Wyniki analizy wykazały, że formy pre-mRNA zawierające retencyjny intron ulegają czasowej akumulacji zarówno w obrębie ciał Cajala, jak i w nukleoplazmie. Wyjątek stanowiło pre-mRNA kodujące białko THOC4, dla którego nie stwierdzono akumulacji w CB – transkrypt ten był obecny wyłącznie w nukleoplazmie (Ryc. 24).

Choć spośród analizowanych transkryptów tylko THOC4, mimo obecności retencyjnego intronu, nie był kierowany do CB, nie można wykluczyć, że podobna sytuacja dotyczy również innych pre-mRNA, które występują w mikrosporocytach, ale nie zostały objęte analizą. Jeśli tak, wówczas hipoteza zakładająca, że sama obecność sekwencji intronowej stanowi wystarczający sygnał do kierowania transkryptów do CB, mogłaby okazać się nieprawdziwa. Możliwe jest, że sygnałem decydującym o lokalizacji

transkryptu do CB jest specyficzna sekwencja nukleotydowa obecna jedynie w wybranej grupie pre-mRNA lub – jak już wspomniano – specyficzne białka wiążące się selektywnie do określonych transkryptów. Należy również uwzględnić możliwość, że brak sygnału z obszaru CB dla pre-mRNA THOC4 wynika z ograniczeń technicznych. Przykładowo, przestrzenna konformacja tego transkryptu w CB mogła utrudniać przyłączenie sondy do docelowej sekwencji lub wiązanie przeciwciał użytych w detekcji. Dokładne wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych, pogłębionych badań eksperymentalnych.

W przypadku dwóch analizowanych pre-mRNA, hnRNP oraz RBM39, zaobserwowano wyraźny, punktowy sygnał zlokalizowany w cytoplazmie, którego intensywność była porównywalna z sygnałem jądrowym (Ryc.28; Ryc.30). Najprawdopodobniej sygnał ten wynika z niespecyficznego wiązania się króliczego przeciwciała pierwotnego anty-DIG. Wyniki reakcji kontrolnej dla tego przeciwciała wykazały bowiem, że może ono generować słaby sygnał, głównie cytoplazmatyczny, niezależnie od obecności docelowego antygeny (Supl.29). Choć najsilniej widoczny był on w przypadku wspomnianych dwóch pre-mRNA, w rzeczywistości sygnał niespecyficzny w cytoplazmie pojawiał się dla wszystkich analizowanych pre-mRNA. W sytuacjach, gdy właściwy sygnał fluorescencji dla pre-mRNA był bardzo wysoki, słaby sygnał wynikający z niespecyficznego wiązania przeciwciała stawał się niewidoczny na tle sygnału specyficznego. Natomiast dla pre-mRNA hnRNP oraz RBM39, charakteryzujących się niską intensywnością sygnału właściwego, intensywność fluorescencji była porównywalna z sygnałem niespecyficznym, co powodowało, że cytoplazmatyczny sygnał stawał się wyraźniej widoczny.

Nie można jednak również całkowicie wykluczyć, obecności sekwencji intronowych w cytoplazmie. Obecność intronów w cytoplazmie może bowiem wskazywać na stabilność niektórych intronowych RNA, co znajduje potwierdzenie w badaniach *Gardnera* i współpracowników (*Gardner* i wsp. 2012). W pracy z 2012 roku autorzy opisali nową klasę stabilnych intronowych RNA (sisRNA) w oocytach *Xenopus tropicalis*, które – mimo że zwykle uznawane są za szybko degradowane – w tym przypadku wykazywały długotrwałą obecność na terenie jądra. Następnie Talhouarne i Gall

pokazali, że wiele z tych intronów, głównie w formie lariatów, obecne było również w cytoplazmie, gdzie wykazywały odporność na degradację (Talhouarne i Gall 2014). Autorzy sugerowali, że takie lariaty mogą pełnić funkcję regulacyjną, potencjalnie wpływając na translację mRNA we wczesnych stadiach embriogenezy – na przykład przez wiązanie regulatorów RNA lub pośredni wpływ na dostępność mRNA do translacji. Obserwowany przez nas sygnał cytoplazmatyczny może więc odzwierciedlać podobny mechanizm stabilizacji i funkcjonalnego wykorzystania intronowego RNA poza jądrem komórkowym.

Inną możliwą hipotezą jest to, że pewna pula pre-mRNA nie ulega post-transkrypcyjnemu splicingowi i w niezmienionej formie trafia do cytoplazmy. Tam może podlegać degradacji na drodze mechanizmu NMD (*ang. nonsense-mediated decay*), co stanowiłoby dodatkowy sposób regulacji poziomu syntetyzowanego białka, lub – alternatywnie – może być wykorzystywana do syntezy odmiennych izoform białkowych. Tego typu mechanizm, w którym transkrypty z retencyjnymi intronami pełnią funkcję elementu regulacyjnego (Braunschweig i wsp. 2014) lub kodują alternatywne warianty białek (Rekosh i Hammarskjöld 2018) został opisany w literaturze. Wyniki te ponownie sugerują, że retencja intronów może być kontrolowanym procesem biologicznym, a nie jedynie wynikiem niedoskonałości splicingu.

Przeprowadzone analizy molekularne potwierdziły, że badane pre-mRNA w mikrosporocytach modrzewia ostatecznie dojrzewają poprzez usunięcie retencyjnych intronów, gdyż wykazano obecność dojrzałych form tych transkryptów. Jedynym wyjątkiem było pre-mRNA RBM39, dla którego nie udało się potwierdzić obecności formy pozbawionej intronu w analizie molekularnej. Oczywiście nie można całkowicie wykluczyć, że taka forma rzeczywiście występuje w komórkach. Brak pozytywnego wyniku reakcji PCR mógł wynikać z przyczyn technicznych, na przykład z niewystarczającej efektywności przyłączania się zaprojektowanych primerów. Natomiast brak detekcji formy dojrzałej w analizie bioinformatycznej transkryptomów mógł być skutkiem utraty odpowiednich odczytów na etapie filtrowania wyników, strat fragmentów RNA podczas izolacji lub przygotowywania bibliotek.

Dodatkowym argumentem przemawiającym za obecnością dojrzałej formy tego transkryptu są wyniki analizy *in situ*, które w tym przypadku były pozytywne. Choć wynik ten wydaje się nietypowy — dojrzała forma była obecna zarówno w ciałach Cajala, jak i w nukleoplazmie oraz cytoplazmie (pod koniec cyklu) — to jeśli zostanie potwierdzony, może wskazywać, że dojrzewanie pre-mRNA, a w szczególności post-transkrypcyjny splicing zachodzi również w ciałach Cajala.

Nie można jednak wykluczyć, że obserwowany sygnał był efektem częściowego wiązania zaprojektowanej sondy, na przykład tylko do fragmentu jednego z eksonów, przy czym drugi koniec sondy pozostawałby wolny. W takim przypadku sonda mogłaby hybrydyzować zarówno do dojrzałego mRNA, jak i do pre-mRNA, ponieważ w obu formach taka sekwencja jest obecna. Możliwe, że hybrydyzacja drugiego końca sondy była niemożliwa ze względu na fizyczne zablokowanie docelowej sekwencji przez wiążące się tam białka. Tłumaczyłoby to jednoczesną lokalizację sygnału w CB (forma niedojrzała) oraz silny sygnał cytoplazmatyczny (forma dojrzała).

Podsumowując, dostępność odpowiedniej ilości białek maszynerii transkrypcyjnej i splicingowej jest kluczowa dla prawidłowego przebiegu tych procesów i bezpośrednio wpływa na ich wydajność. Retencja mRNA kodujących te białka może pełnić rolę mechanizmu „magazynowania” transkryptów, które powstają w okresach wysokiej aktywności transkrypcyjnej, a są wykorzystywane w późniejszym etapie, gdy aktywność transkrypcyjna ulega znacznemu obniżeniu. Taki sposób regulacji pozwala komórce przygotować się na moment zwiększonego zapotrzebowania na białka niezbędne do przeprowadzenia transkrypcji i splicingu, szczególnie w kontekście obserwowanego cyklicznego wzrostu aktywności transkrypcyjnej w ściśle określonym przedziale czasowym.

Warto jednak zwrócić uwagę na istotne ograniczenie tej strategii. Nawet przy zwiększonej syntezie tych białek przed kolejnym pulsem aktywności transkrypcyjnej istnieje ryzyko, że ich ilość okaże się niewystarczająca. Niedobór białek splicingowych może wówczas prowadzić do retencji intronów, zwłaszcza tych o słabszych miejscach

splicingowych, co w konsekwencji może skutkować globalną retencją poli(A)RNA obserwowaną w badanych komórkach.

Ponieważ introny ulegające retencji charakteryzują się na ogół słabszymi miejscami splicingowymi w porównaniu do innych intronów, są one szczególnie wrażliwe na spadek stężenia czynników splicingowych (Braunschweig i wsp. 2014). W efekcie taki deficyt może istotnie wpłynąć na prawidłowe dojrzewanie transkryptów, a tym samym na ogólną dynamikę ekspresji genów w komórce.

6.4 Dynamika składu ciał Cajala zależna od pełnionej funkcji w cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA

Ciała Cajala w mikrosporocytach modrzewia stanowią ważną oś w cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA. To w nich gromadzone są nie w pełni dojrzałe mRNA i to one są, ważnym elementem warunkującym eksport tych cząsteczek do cytoplazmy (Rudzka i wsp. 2022). Oprócz tej ‘nadzwyczajnej’ funkcji, ciała Cajala – podobnie jak w innych komórkach – biorą udział w procesie biogenezy U snRNP. Długi czas trwania pojedynczego cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA pozwala na dokładne prześledzenie w jaki sposób zmieniają się ciała Cajala dostosowując się precyzyjnie do aktualnej swojej roli w danym momencie cyklu.

Dynamiczne zmiany składu molekularnego ciał Cajala obserwowane w mikrosporocytach najprawdopodobniej wynikają z ich roli w przestrzennej i czasowej organizacji różnych procesów metabolicznych. W zależności od aktualnych potrzeb komórki, skład tych kondensatów może zatem ulegać istotnym i dynamicznym modyfikacjom.

Biogeneza U snRNP

Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w wynikach przeprowadzonych badań dotyczących biogenezy U snRNP – integralnych składników kompleksu spliceosomalnego, dla których ciała Cajala stanowią miejsce ostatecznego dojrzewania oraz przechowywania. Analiza przebiegu dojrzewania tych cząsteczek nabrała szczególnego znaczenia w kontekście obserwowanej pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej, która

stwarza konieczność szybkiego złożenia dużej liczby kompleksów splicingowych bezpośrednio przed oraz w trakcie trwania pulsu transkrypcyjnego. Co istotne, wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że również same snRNA syntetyzowane są w sposób pulsacyjny, skorelowany z okresami wzmożonej aktywności transkrypcyjnej mRNA (Ryc.33). Podobnie jak w przypadku polimerazy RNA II syntetyzującej mRNA, aktywność polimerazy odpowiedzialnej za transkrypcję snRNA była najwyższa w stadium 1, a następnie stopniowo malała w kolejnych stadiach (Ryc.14). W przeciwieństwie do dobrze udokumentowanego zjawiska pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej genów kodujących mRNA, zjawisko pulsacyjnej syntezy snRNA nie zostało dotychczas opisane w literaturze naukowej.

Wyniki przeprowadzonych badań mogą zatem stanowić istotny wkład w lepsze zrozumienie dynamiki biogenezy snRNA i wskazywać na możliwość istnienia dotąd nieopisanego mechanizmu regulacji ich transkrypcji, który – podobnie jak w przypadku mRNA – przebiegałby w formie powtarzających się faz intensywnej syntezy poprzedzianych okresami względnej ciszy transkrypcyjnej. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych, pogłębionych badań, które pozwolą jednoznacznie potwierdzić, czy obserwowane zmiany rzeczywiście odzwierciedlają pulsacyjny charakter syntezy snRNA i w jaki sposób ten proces może być sprzężony z cykliczną aktywnością transkrypcyjną oraz funkcjonowaniem ciał Cajala jako ośrodków dojrzewania i akumulacji tych cząsteczek.

Pierwszy z etapów cytoplazmatycznego dojrzewania nowo zsintetyzowanych snRNA, polegający przyłączeniu heptametrycznego pierścienia białek Sm przypadał na stadium 4 oraz 5 (Ryc.34). Kolejny etap tj. modyfikacja końca 5' prowadząca do utworzenia czapeczki trimetyloguanozynowej na eksportowanych U snRNP również, obserwowana była w tym samym momencie – stadium 4 i 5 (Ryc.35). Dodatkowym potwierdzeniem momentu przeprowadzania tej modyfikacji są wyniki immunoznakowania enzymu TGS1, katalizującego proces metylacji, które wykazały jego obecność oraz aktywność w cytoplazmie w tym samym okresie, w którym obserwowano czapeczkę TMG (stadia 4 i 5)(Ryc.36; Ryc.37). Warto podkreślić, że choć obserwowany jądrowy sygnał dla TGS1

nie odgrywa kluczowej roli w badanym procesie, to najprawdopodobniej nie jest przypadkowy ani nie stanowi artefaktu. Chociaż funkcje jądrowe TGS1 w komórkach roślinnych pozostają dotychczas nie w pełni poznane, to w komórkach kręgowców wykazano jego udział w hipermetylacji snoRNA (Girard i wsp. 2008). Zatem cytoplazmatyczne nagromadzenie białek Sm, enzymu TGS1 oraz obecności czapeczki TMG pod koniec cyklu zbiegają się ze sobą czasowo i przestrzennie, co wspiera hipotezę, że właśnie na tym etapie cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA dochodzi do cytoplazmatycznego dojrzewania syntetyzowanych na początku cyklu snRNA.

Warto podkreślić, że czas, jaki upływa pomiędzy syntezą snRNA (stadium 1-3) a jego eksportem i dojrzewaniem w cytoplazmie (stadium 4-5), jest bardzo długi. Biorąc pod uwagę długość poszczególnych stadiów, można oszacować, że maksymalny czas jaki może upłynąć od momentu syntezy snRNA do rozpoczęcia jego cytoplazmatycznego dojrzewania może wynosić nawet do 11 dni. Nowo syntetyzowane snRNA są w tym czasie najprawdopodobniej przetrzymywane na terenie jądra. Możliwe, że celem ich zatrzymania w jądrze jest opóźnienie momentu cytoplazmatycznego dojrzewania, tak aby duża pula gotowych do udziału w splicingu cząsteczek pojawiała się ponownie w jądrze dopiero na początku kolejnego cyklu.

Na podstawie przeprowadzonych badań nie można jednoznacznie określić, w którym dokładnie przedziale jądra komórkowego lokalizują się niedojrzałe cząsteczki pre-snRNA. Nie można jednak wykluczyć, że miejscem ich czasowego przechowywania przed eksportem do cytoplazmy są również ciała Cajala. Dane literaturowe wskazują bowiem, że po transkrypcji snRNA (U1, U2, U4, U5) są transportowane do ciał Cajala, gdzie formowany jest kompleks eksportowy niezbędny do ich dalszego transportu do cytoplazmy (Ohtani 2018). W badaniach przeprowadzonych przez Smith i Lawrence również wykazano, że pre-snRNA pozbawione dojrzałego końca 3' akumulują się właśnie w CB (Smith i Lawrence 2000). Możliwe zatem, że moment uwolnienia pre-snRNA do cytoplazmy jest regulowany poprzez modulowanie dostępności kompleksu eksportującego, którego formowanie zachodzi prawdopodobnie w obrębie ciał (Ohtani 2018). Akumulacja niedojrzałych form snRNA w ciałach Cajala mogłaby tłumaczyć obserwowany pod koniec cyklu poli(A)RNA wysoki poziom sygnału U2 snRNA

w tym przedziale jądrowym (Ryc. 35). Nagromadzenie znacznych ilości U2 snRNA w CB oraz nukleoplazmie pod koniec cyklu najprawdopodobniej nie odzwierciedla obecności dojrzałej formy, ponieważ sygnał odpowiadający zmodyfikowanej czapeczce TMG oraz białkom Sm (charakterystycznym dla form powracających z cytoplazmy) jest w tym czasie wykrywany wyłącznie w cytoplazmie (Ryc.35). Aby potwierdzić te przypuszczenia, konieczne są jednak dalsze badania pozwalające na bezpośrednią detekcję oraz określenie lokalizacji niedojrzałych form pre-snRNA. Koniec cyklu wydaje się być zatem etapem intensywnego przetwarzania cytoplazmatycznego snRNA zsyntetyzowanych na początku cyklu, które następnie wracają do jądra, gdzie po przejściu ostatecznych etapów dojrzewania (zachodzących w CB) mogą zostać wykorzystane podczas kolejnego pulsu aktywności transkrypcyjnej. Wysokie nagromadzenie U snRNP zawierających pierścieni białek Sm oraz zmodyfikowaną czapeczkę TMG obserwowane na początku cyklu (stadium 1 i 2) w nukleoplazmie oraz CB wspiera tę hipotezę.

Analizując dynamikę składu molekularnego ciał Cajala, warto podkreślić, że początek cyklu, charakteryzujący się akumulacją dojrzałych U snRNP w CB, jest jednocześnie okresem gromadzenia ogromnych ilości poliadenylowanych transkryptów w obrębie tych kondensatów. Dla kontrastu, pod koniec cyklu, kiedy ciała pozbawione są dojrzałych cząsteczek U snRNP, akumulacja poli(A)RNA nie zachodzi. Różnice te wyraźnie wskazują, że skład molekularny CB na początku i na końcu cyklu znacząco się różni.

Przechodząc do początkowych etapów cyklu, szczególnie interesujące są obserwacje dotyczące stadium 1, wskazujące na charakterystyczną lokalizację białek Sm oraz czapeczki TMG w obszarach peryferyjnych jądra, co może odzwierciedlać moment powrotu cząsteczek U snRNP z cytoplazmy do jądra. Na tym etapie stwierdzono także stopniową akumulację tych cząsteczek w obrębie ciał Cajala. Od stadium 3 natomiast, obserwowano wyraźny spadek dojrzałych U snRNP, co sugeruje, że cząsteczki te są intensywnie wykorzystywane w trakcie transkrypcji oraz tuż po pulsie aktywności transkrypcyjnej tj. w obróbce post-transkrypcyjnej retencyjnych transkryptów.

Dane literaturowe wskazują na stosunkowo długi okres półtrwania snRNA (Matera i Wang 2014). Przykładowo, U1 snRNA charakteryzuje się wyjątkową stabilnością, podczas gdy U2 snRNA wykazuje okres półtrwania wynoszący około dwóch cykli komórkowych tj. około 48 godzin (Sauterer i wsp. 1988). Ponadto, w przypadku funkcjonalnych kompleksów snRNP, takich jak U2, U4/U6 czy U4/U6-U5, wykazano, że po zakończeniu ich funkcji w procesie splicingu, podjednostki tych kompleksów mogą być transportowane do ciał Cajala w celu regeneracji i ponownego wykorzystania w kolejnych rundach transkrypcyjnych (Love 2017). Sugeruje to, że nowo syntetyzowana pula U snRNP na początku cyklu w komórkach modrzewia może być efektywnie zachowana i wielokrotnie wykorzystywana przez bardzo długi czas (około 10-11 dni), dzięki wydajnym mechanizmom recyklingu.

Dotychczas w literaturze opisywano raczej płynny model obrotu U snRNP, w którym cząsteczki stopniowo ulegają degradacji i są na bieżąco zastępowane nowo zsyntetyzowanymi. Natomiast w mikrosporocytach modrzewia obserwujemy wyraźny, zsynchronizowany schemat: po długiej fazie intensywnego wykorzystania U snRNP (około 10 dni) następuje globalna degradacja zużytych kompleksów, a następnie odtworzenie nowej puli przed kolejnym pulsem transkrypcyjnym. Taki cykliczny mechanizm „masowego odnowienia” może być szczególną adaptacją komórek linii generatywnej do pulsacyjnego charakteru transkrypcji, zapewniając krótkookresową dostępność dużej liczby w pełni dojrzałych czynników splicingowych dokładnie wtedy, gdy są najbardziej potrzebne.

Choć nasze wyniki wpisują się w znany model długiego okresu półtrwania U snRNP, wskazują jednocześnie na istnienie dotąd nieopisanego zjawiska globalnej, skoordynowanej degradacji i odnowy puli U snRNP. Dalsze badania pozwolą szczegółowo wyjaśnić dynamikę tego procesu i jego znaczenie dla regulacji ekspresji genów w mikrosporocytach.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że w mikrosporocytach, w momencie wykorzystania zgromadzonych w CB dojrzałych U snRNP w stadiach 1 i 2 oraz kolejnych, równocześnie już od stadium 1 rozpoczyna się *de novo* synteza nowych cząsteczek snRNA. Świeżo syntetyzowane snRNA podlegają następnie procesowi dojrzewania

i stopniowej akumulacji w CB, przygotowując się do pełnienia swojej funkcji w kolejnej rundzie transkrypcyjnej.

Takie zsynchronizowanie degradacji i odnowy puli snRNA może odgrywać kluczową rolę w utrzymaniu ciągłości i wysokiej efektywności procesu splicingu podczas cyklicznych pulsów transkrypcyjnych. Obserwowana w tym modelu cykliczna synteza *de novo*, a następnie degradacja cząsteczek U snRNP, wydaje się być bezpośrednio skorelowana z pulsacyjnym charakterem transkrypcji mRNA. Taki mechanizm może stanowić istotną strategię adaptacyjną, umożliwiającą intensyfikację splicingu w ściśle określonych oknach czasowych i zapewniającą dostępność dużej liczby w pełni dojrzałych cząsteczek U snRNP dokładnie w momencie największego zapotrzebowania.

Z drugiej strony pulsacyjny charakter syntezy czynników splicingowych oraz ich ograniczona dostępność na bardzo wczesnych etapach gwałtownego wzrostu aktywności transkrypcyjnej mogą prowadzić do globalnej retencji poli(A)RNA, obserwowanej w tym modelu.

Podczas intensywnej transkrypcji silne miejsca splicingowe są wykorzystywane w pierwszej kolejności natomiast sekwencje intronowe oflankowane słabymi miejscami splicingowymi mogą nie zostać ko-transkrypcyjnie wycięte, co w efekcie prowadzi do powstawania transkryptów pre-mRNA z intronami retencyjnymi. W celu potwierdzenia tej hipotezy niezbędne będzie jednak przeprowadzenie dalszych, szczegółowych analiz.

Niezależnie od tego, czy okresowa, pulsacyjna synteza snRNA stanowi zamierzony, regulacyjny mechanizm intensyfikacji składania kompleksów splicingowych tuż przed kolejnym pulsem aktywności transkrypcyjnej, czy też – przeciwnie – jest zjawiskiem, które przyczynia się do obniżenia efektywności splicingu, prowadząc tym samym do globalnej retencji transkryptów z RI, kluczowe wydaje się zwrócenie uwagi na szczególną rolę ciał Cajala w buforowaniu dostępności maszyneryi splicingowej. Struktury te wykazują wyraźnie dynamiczny charakter, elastycznie zmieniając swój skład molekularny w odpowiedzi na bieżące potrzeby komórki. W zależności od etapu cyklu transkrypcyjnego, ciała Cajala mogą pełnić rolę magazynu niedojrzałych form pre-snRNA, a w kolejnych momentach – jednocześnie gromadzić zarówno formy

niedojrzałe, które stopniowo w odpowiednim momencie zostaną skierowane do cytoplazmy, jak i formy w pełni dojrzałe, gotowe do natychmiastowego włączenia w proces splicingu. Taka dynamiczna reorganizacja ciał Cajala podkreśla ich istotną funkcję w przestrzennej i czasowej kontroli dojrzewania oraz dostępności U snRNP, co może mieć kluczowe znaczenie dla utrzymania płynności procesów obróbki post-transkrypcyjnej w warunkach pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej.

Dystrybucja białka koiliny

Niezwykle interesującym, a zarazem nieoczekiwanym aspektem dynamicznych zmian w składzie ciał Cajala podczas cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA w mikrosporocytach modrzewia jest obserwowane okresowe zanikanie białka koiliny z tych przedziałów jądrowych. Koilina jest powszechnie uznawana za kluczowe białko markerowe CB, pełniące zasadniczą rolę w tworzeniu i stabilizowaniu ich struktury. Dane literaturowe wskazują, że po usunięciu koiliny obserwuje się, że niektóre składniki ciał Cajala tworzą alternatywne struktury, zwane „ciałkami resztkowymi”, które jednak nie zawierają U snRNP, co wskazuje na kluczową rolę koiliny w zbliżaniu wszystkich składników kondensatu (Staněk 2023). Choć dotychczasowe badania wskazują, że obecność koiliny jest niezbędna nie tylko dla powstawania, lecz również dla utrzymania prawidłowej architektury i funkcji tych struktur (Staněk i Neugebauer 2006), wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie sugerują, iż ciała Cajala mogą zachować integralność strukturalną pomimo czasowej nieobecności tego białka (Ry.38).

W toku przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że moment zaniku koiliny z obszaru ciał Cajala przypada na stadium 4 oraz 5 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA, przy czym stopniowe obniżanie poziomu sygnału fluorescencyjnego tego białka w obrębie tych struktur widoczne było już w stadium 3. Wyniki te mogą sugerować, iż koilina podlega wówczas stopniowej degradacji bądź przemieszczeniu do innych przedziałów jądrowych, co może być elementem regulacji cyklicznej aktywności CB w określonych procesach molekularnych. Równolegle, w tym samym okresie, w cytoplazmie odnotowano wyraźne zwiększenie punktowego sygnału fluorescencyjnego (Ryc.38). Obserwacja ta może wskazywać na moment syntezy *de novo* koiliny, która następnie,

w kolejnych stadiach cyklu (stadium 1 oraz 2), jest ponownie importowana do jądra i akumulowana w obrębie CB.

Warto podkreślić, że choć czasowe, całkowite zanikanie koiliny z obszaru ciał nie zostało dotychczas szczegółowo opisane w literaturze, to dostępne dane literaturowe wskazują na istnienie dynamicznej, ciągłej wymiany cząsteczek koiliny pomiędzy CB a nukleoplazmą (Deryusheva i Gall 2004). Można przypuszczać, iż synteza białka koiliny, zachodząca jedynie w wąskim oknie czasowym, wpływa na chwilową dysregulację stałej wymiany koiliny pomiędzy ciałami Cajala a nukleoplazmą, w której przez pewien okres białko to nie jest obecne (stadium 3, 4 oraz 5). Przejściowy niedobór koiliny w nukleoplazmie, będący skutkiem istotnych zmian w poziomie cytoplazmatycznej puli tego białka, może w takiej sytuacji prowadzić do czasowego obniżenia jej ilości w obrębie CB.

Z drugiej strony czasowe zanikanie koiliny może pozostawać w ścisłym związku z cykliczną syntezą cząsteczek U snRNP w badanych komórkach. Koilina odgrywa bowiem kluczową rolę w rekrutacji U snRNP do ciał Cajala. Jak wykazano w badaniach przeprowadzonych przez Lemm i współpracowników, prawidłowa lokalizacja koiliny w obrębie CB jest ściśle zależna od poprawnego przebiegu biogenezy cząsteczek U snRNP (Lemm i wsp. 2006). Autorzy ci udowodnili, że obniżenie poziomu białek zaangażowanych w ten proces skutkuje zaburzeniem dojrzewania U snRNP oraz uniemożliwia ich ponowny import do jądra komórkowego, co w konsekwencji prowadzi do rozproszenia koiliny w nukleoplazmie. Wyniki te jednoznacznie potwierdzają zatem istnienie funkcjonalnej zależności pomiędzy obecnością dojrzałych cząsteczek U snRNP a lokalizacją koiliny w obrębie ciał Cajala.

Można zatem przypuszczać, że w mikrosporocytach modrzewia, w sytuacji czasowego braku gotowych do eksportu cząsteczek U snRNP, koilina przestaje być chwilowo niezbędna w istniejących już ciałach Cajala. Wracając do wyników badań zespołu Lemm, należy podkreślić, że choć w ich przypadku wywołane eksperymentalnie zaburzenia procesu dojrzewania U snRNP prowadziły do dezintegracji ciał Cajala,

nie musi to oznaczać, iż w warunkach fizjologicznych struktury te nie są zdolne do przetrwania mimo przejściowej nieobecności koiliny.

Dowodem wspierającym powyższe rozważania mogą być wyniki badań przeprowadzonych przez zespół Fujioka, który zaobserwował, że w jądrach komórek *Arabidopsis* występują zarówno ciała Cajala pozbawione koiliny, jak i ciała Cajala zawierające to białko (Fujioka i wsp. 2007). Obserwacje te sugerują, iż choć koilina najprawdopodobniej odgrywa kluczową rolę w procesie formowania się ciał Cajala, jej obecność może mieć mniejsze znaczenie dla utrzymania integralności struktur już uformowanych. Co więcej badania przeprowadzone przez inny zespół wykazały, że krótkotrwała nadekspresja egzogenego białka SmB w liniach komórkowych HeLa jest wystarczająca, by zaindukować przejściowe formowanie ciał Cajala. Dane te wskazują zatem, że poziom ekspresji białek U snRNP oraz proces ich składania, a nie poziom ekspresji koiliny czy białka SMN, mogą stanowić kluczowy czynnik inicjujący powstawanie CB (Sleeman i wsp. 2001). Z kolei według hipotezy zaproponowanej przez Pontes i Pikaard, w komórkach może istnieć wiele rodzajów ciał Cajala, różniących się składem molekularnym oraz pełnionymi funkcjami (Pontes i Pikaard 2008). W przypadku mikrosporocytów modrzewia należy jednak zauważyć, że obserwowany zanik koiliny dotyczył wszystkich ciał Cajala bez wyjątku, co może dodatkowo wspierać hipotezę, że zjawisko to stanowi odpowiedź na czasowy brak dostępnych dojrzałych cząsteczek U snRNP, a co zatem idzie zmianę dotąd pełnionej roli.

Podsumowując, w badanym modelu zaobserwowano dynamiczne zmiany składu molekularnego ciał Cajala, ściśle związane ze zmianą ich funkcji w poszczególnych etapach cyklu. Początek cyklu, będący momentem akumulacji na terenie CB poliadenylowanych RNA oraz dojrzałych U snRNP gotowych do wykorzystania w intensywnym splicingu, jest okresem, w którym ciała Cajala pełnią funkcję magazynującą tych cząsteczek oraz buforują ich uwalnianie do nukleoplazmy. Natomiast koniec cyklu, charakteryzujący się akumulacją głównie niedojrzałych snRNA, to czas, w którym ciała Cajala wciąż magazynują cząsteczki, ale przede wszystkim buforują moment ich uwolnienia z jądra do cytoplazmy. W efekcie mechanizmy

te bezpośrednio warunkują moment dostępności dojrzałych U snRNP i umożliwiają synchronizację procesu splicingu z cykliczną transkrypcją.

Dynamika zmian przestrzennej lokalizacji białek i RNA w obrębie ciał Cajala

Poza dynamicznymi zmianami w ogólnym składzie ciał Cajala, zaobserwowano również zmienność w przestrzennej lokalizacji poszczególnych białek oraz RNA w ich obrębie. Udokumentowane na materiale fotograficznym sferyczne lokalizacje cząsteczek zawierających czapeczkę TMG (Ryc.39.1 – stadium wczesne 1), białek Sm (Ryc.39.2 – stadium 2) oraz koiliny (Ryc.39 stadium 1) najprawdopodobniej odzwierciedlają etapową akumulację tych komponentów w ciałach Cajala. Przedstawiony materiał ilustruje kolejne fazy tego procesu – od struktur z wyraźnie zaznaczoną, peryferyjnie zlokalizowaną sferyczną akumulacją, aż do jednorodnego rozmieszczenia sygnału w całym ciecie Cajala, bez widocznej segregacji przestrzennej. Nie można jednak wykluczyć, że obserwowana czasowa akumulacja cząsteczek U snRNP (identyfikowanych pośrednio na podstawie obecności czapeczki TMG i białek Sm) oraz koiliny w obszarach peryferyjnych ciał Cajala odgrywa istotną rolę funkcjonalną, co wymaga dalszych, pogłębionych badań.

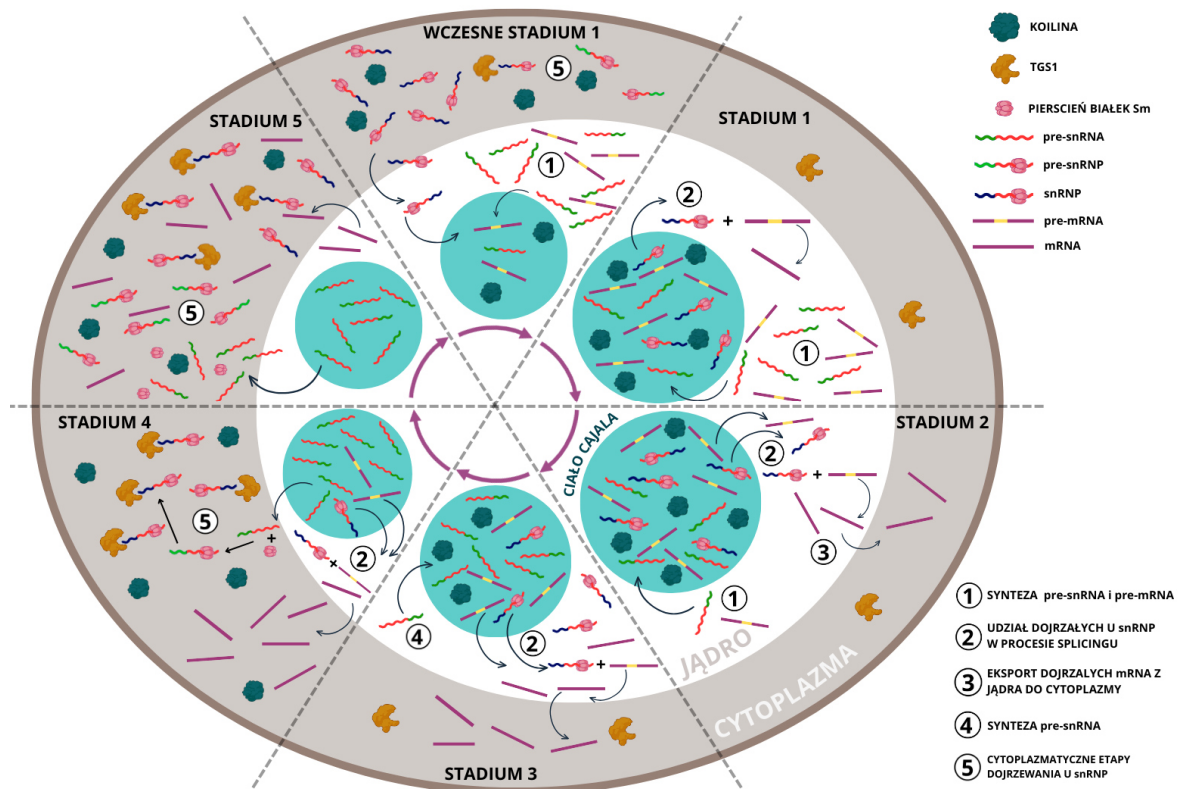
Z kolei zaobserwowana sferyczna lokalizacja mRNA kodującego białko RBM39 w stadium 3 może wskazywać na etap przygotowujący te cząsteczki do eksportu z ciał Cajala do nukleoplazmy. Sugeruje to wcześniejsze, równomierne upakowanie ciał Cajala, widoczne w stadium 2. Dodatkowym argumentem wspierającym tę hipotezę są wyniki przedstawione na Ryc.30, które pokazują, że w stadium 4 dojrzałe mRNA nie są już obecne w ciałach Cajala, a ich lokalizacja ogranicza się głównie do cytoplazmy. Nie można jednak wykluczyć, że czasowa akumulacja mRNA na peryferiach kondensatów pełni również istotną rolę funkcjonalną, ułatwiając przebieg kluczowych procesów przygotowujących mRNA do dalszego transportu najpierw do nukleoplazmy, a następnie do cytoplazmy. Obszary peryferyjne ciał Cajala cechują się bowiem większą dostępnością do czynników nukleoplazmatycznych, które mogą być niezbędne dla efektywnego eksportu dojrzałych transkryptów.

Na szczególną uwagę zasługuje zaobserwowana w stadium 3, dotychczas nieopisywana w literaturze lokalizacja białka koiliny w obrębie ciał Cajala. Na tym etapie cyklu w części ciał Cajala sygnał koiliny wypełniał ich strukturę równomiernie, tworząc jednorodny obraz fluorescencyjny (Ryc.39.3 – stadium 3). Natomiast w pozostałych ciałach Cajala odnotowano wyraźnie polarny układ tego białka. W tym drugim przypadku widoczna była wyraźna strefowość rozmieszczenia: obszary o podwyższonej koncentracji koiliny przeplatały się z regionami niemal całkowicie pozbawionymi jej sygnału (Ryc.39.3 – stadium 3). Zjawisko to może sugerować dynamiczne przemodelowywanie wewnętrznej organizacji ciał Cajala w stadium 3, potencjalnie związane z etapowym przebiegiem procesów, takich jak chociażby dojrzewanie nowej puli U snRNP.

Co więcej, w jednym z ciał całkowicie wypełnionych koiliną zaobserwowano zjawisko, które potencjalnie mogłoby świadczyć o uchwyceniu momentu separacji opisanego przez Platani i zespół (Platani i wsp. 2000), a więc powstawania kilku mniejszych ciał z jednego większego. Przemawia za tym obecność wyraźnej agregacji koiliny, prowadzącej do wyodrębnienia się wewnątrz tej struktury kilku sferycznych form (Ryc.39.3 – stadium 3). Zasadne wydaje się jednak pytanie, jaki byłby cel takiego procesu fragmentacji ciał Cajala. Ponad to wyniki uzyskane dla innego markera CB tj. U2 snRNA nie wskazują, aby pod koniec cyklu komórkowego następował istotny wzrost liczby mniejszych ciał Cajala. Zweryfikowanie tej hipotezy wymagałoby przeprowadzenia dodatkowych, pogłębionych badań eksperymentalnych.

Nie można przy tym całkowicie wykluczyć, że obserwowany obraz wynika z ograniczeń natury technicznej. Przykładowo, wyraźniejsze sygnały fluorescencji widoczne na obwodzie ciała w porównaniu do jego centralnej części mogą być skutkiem utrudnionej penetracji przeciwciała do wnętrza tej gęsto upakowanej struktury. Utrudnienie to może wynikać zarówno z obecności dużej ilości poliadenylowanych transkryptów akumulowanych w CB, jak i z fizycznych ograniczeń dostępu przeciwciała do antygeny zlokalizowanego w głębszych partiach ciała.

Na poniższym schemacie w uproszczeniu przedstawiono dynamikę zmian składu molekularnego ciał Cajala, które zachodzą w trakcie cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA (Ryc.40).



Ryc. 40 Schematyczne przedstawienie dynamicznych zmian składu molekularnego ciał Cajala w cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.

7. PODSUMOWANIE

1. W mikrosporocytach modrzewia europejskiego zaobserwowano występowanie naprzemiennych faz wzmożonej aktywności transkrypcyjnej (trwające około 8–9 dni), oddzielonych krótszymi okresami względnej ciszy transkrypcyjnej (około 2 dni).
2. W badanych komórkach stwierdzono występowanie globalnej retencji poliadenylowanych RNA. Szczegółowa analiza poszczególnych transkryptów wykazała istotne różnice w dynamice ich eksportu do cytoplazmy, co pozwoliło na wyróżnienie i scharakteryzowanie odmiennych wzorców syntezy i transportu mRNA.
3. Zaobserwowana odmienna dynamika eksportu poszczególnych mRNA może pełnić rolę precyzyjnego mechanizmu kontroli czasu syntezy kodowanych przez nie białek. Zarówno retencja, jak i regulowany eksport poli(A)RNA umożliwiają komórce efektywne zarządzanie rezerwuarem transkryptów w odpowiedzi na dynamiczne zmiany w ekspresji genów, stanowiąc tym samym kluczowe strategie adaptacyjne.
4. Jak ustalono, większość transkryptów akumulowanych w ciałach Cajala zawiera jedną lub więcej sekwencji intronowych, które w późniejszym etapie zostają usunięte w procesie post-transkrypcyjnego splicingu. Retencyjne introny są najprawdopodobniej eliminowane bezpośrednio po uwolnieniu transkryptu z ciała Cajala, a tuż przed jego eksportem do cytoplazmy, co wskazuje, że ciała Cajala stanowią kluczowy etap w drodze retencyjnych mRNA do cytoplazmy.
5. mRNA kodujące białka maszynery transkrypcyjnej i splicingowej ulegają jądrowej retencji, co może modulować dojrzewanie innych transkryptów i sprzyjać ich czasowej retencji w jądrze.
6. Oprócz dynamicznej wymiany transkryptów pomiędzy ciałami Cajala a nukleoplazmą, w trakcie cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA obserwowano także inne zmiany w składzie molekularnym CB. Koilina, będąca markerem ciał Cajala, występowała w pierwszej połowie cyklu, natomiast w drugiej ulegała stopniowemu

zanikowi. Z kolei w odniesieniu do snRNP, początkowe etapy cyklu charakteryzowały się akumulacją dojrzałych cząsteczek U snRNP, podczas gdy w późniejszych fazach dominowało nagromadzenie snRNA.

7. Na początku cyklu ciała Cajala działają głównie jako miejsca gromadzenia dojrzałych kompleksów U snRNP, które są następnie wykorzystywane w pierwszej kolejności w ko-transkrypcyjnym splicingu. W miarę postępu cyklu ich funkcja ulega zmianie – CB stają się miejscem akumulacji snRNA, przygotowując te cząsteczki do eksportu z jądra do cytoplazmy.
8. Obecność koiliny w ciałach Cajala we wczesnych etapach cyklu potwierdza jej kluczową rolę w rekrutacji U snRNP oraz inicjacji tworzenia tej struktury, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi. Jednakże jej nieobecność w CB pod koniec cyklu wskazuje, że nie jest ona niezbędna dla utrzymania integralności strukturalnej ciała w późnej fazie cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.

WYKAZ RYCIN I TABEL

Ryc. 1 Schemat przedstawiający role kondensatów oraz siły jakie napędzają zjawisko LLPS.....	17
Ryc. 2 Schemat przedstawiający hipotetyczne modele samoasocjacji molekularnych biokondensatów.....	19
Ryc. 3 Schemat przedstawiający funkcjonalne domeny koiliny oraz partnerów z którymi oddziałuje.....	21
Ryc. 4 Biogeneza U snRNP.....	28
Ryc. 5 Schemat przedstawiający reakcję pseudourydylacji i 2'-O-metylacji...	29
Ryc. 6 Schematyczne przedstawienie struktury dwóch głównych klas snoRNA.....	31
Ryc. 7 Schematyczne przedstawienie 7 głównych etapów regulacji ekspresji genów u eukariontów.....	39
Ryc. 8 Cykl splicingu pre-mRNA oraz główne elementy spliceosomu.....	43
Ryc. 9 Pięć głównych zdarzeń alternatywnego splicingu.....	46
Ryc. 10 Stadia cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	48
Ryc.11 Schemat przedstawiający kolejne etapy elektroforezy SDS-PAGE.....	75
Ryc. 12 Schemat przedstawiający wszystkie warstwy oraz elementy aparatu stosowanego podczas transferu białek z żelu poliakrylamidowego na membranę PVDF.....	76
Ryc. 13 Cykl syntezy i eksportu poli(A)RNA z uwzględnieniem czasu trwania poszczególnych stadiów.....	86
Ryc. 14 Rozmieszczenie aktywnej formy polimerazy RNA II podczas cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	87
Ryc. 15 Pierwszy wzorzec syntezy i eksportu mRNA.....	89
Ryc. 16 Drugi wzorzec syntezy i eksportu mRNA.....	90
Ryc. 17 Analiza mRNA SERRATE i białka SERRATE w cyklu poli(A)RNA.....	91
Ryc. 18 Alternatywny wzorzec syntezy i eksportu mRNA.....	92

Ryc. 19 Szczegółowa analiza mRNA kodującego podjednostkę RPB10 polimerazy RNA II i nieufosforylowanego białka polimerazy RNA II ...	96
Ryc. 20 Retencja pre-mRNA Sm zachodzi głównie w ciałach Cajala.....	99
Ryc. 21 Porównanie rozmieszczenia różnych form mRNA Sm.....	100
Ryc. 22 Lokalizacja białek Sm w stadium 5 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	101
Ryc. 23 Tabela podsumowująca wyniki analiz badanych transkryptów.....	105
Ryc. 24 Analiza pre-mRNA białka RS2Z32 w cyklu poli(A)RNA.....	106
Ryc. 25 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre- mRNA RS2Z32.....	107
Ryc. 26 Analiza pre-mRNA białka THOC4 w cyklu poli(A)RNA.....	108
Ryc. 27 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre- mRNA THOC4.....	109
Ryc. 28 Analiza pre-mRNA białka hnRNP Q-like isoform X1 w cyklu poli(A)RNA.....	110
Ryc. 29 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre- mRNA hnRNP Q-like isoform X1.....	111
Ryc. 30 Analiza pre-mRNA białka RBM39 w cyklu poli(A)RNA.....	113
Ryc. 31 Uproszczony schemat struktury analizowanego transkryptu pre- mRNA RBM39.....	114
Ryc. 32 Analiza mRNA białka RBM39 w cyklu poli(A)RNA.....	117
Ryc. 33 Synteza snRNA w cyklu poli(A)RNA.....	123
Ryc. 34 Rozmieszczenie białek Sm podczas cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	125
Ryc. 35 Lokalizacja U snRNP z modyfikacją końca 5' w cyklu poli(A)RNA.....	127
Ryc. 36 Lokalizacja enzymu TGS1 w cyklu poli(A)RNA.....	128
Ryc. 37 Jednoczesna lokalizacja U snRNP z czapeczką TMG oraz enzymu TGS1 w stadium 1 cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	129

Ryc. 38 Lokalizacja koiliny w cyklu poli(A)RNA.....	132
Ryc. 39 Strefowość występowania białek oraz RNA w ciałach Cajala.....	134
Ryc. 40 Schematyczne przedstawienie dynamicznych zmian składu molekularnego ciał Cajala w cyklu syntezy i eksportu poli(A)RNA.....	163

LITERATURA

1. Alexander JM, Guan J, Li B, Maliskova L, Song M, Shen Y, Huang B, Lomvardas S, Weiner OD. 2019. Live-cell imaging reveals enhancer-dependent Sox2 transcription in the absence of enhancer proximity. *eLife* 8, e41769.
2. Bahar Halpern K, Caspi I, Lemze D, Levy M, Landen S, Elinav E, Ulitsky I, Itzkovitz S. 2015. Nuclear retention of mRNA in mammalian tissues. *Cell Reports* 13(12), 2653–2662.
3. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(5), 285–298.
4. Barbazuk WB, Fu Y, McGinnis KM. 2008. Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges. *Genome Research* 18(9), 1381–1392.
5. Batchelor E, Loewer A, Mock C, Lahav G. 2011. Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Molecular Systems Biology* 7, 488.
6. Berchtold D, Battich N, Pelkmans L. 2018. A systems-level study reveals regulators of membrane-less organelles in human cells. *Molecular Cell* 72(6), 1035–1049.
7. Bergeron D, Laforest C, Carpentier S, Calvé A, Deschamps-Francoeur G, Scott MS. 2021. SnoRNA copy regulation affects family size, genomic location and family abundance levels. *BMC Genomics* 22, 414.
8. Bitá CE i Gerats T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* 4, 273.
9. Bohnsack MT i Sloan KE. 2018. Modifications in small nuclear RNAs and their roles in spliceosome assembly and function. *Biological Chemistry* 399(11), 1265–1276.
10. Boothby TC i Wolniak SM. 2011. Masked mRNA is stored with aggregated nuclear speckles and its asymmetric redistribution requires a homolog of mago nashi. *BMC Cell Biology* 12, 45.
11. Boothby TC, Zipper RS, van der Weele CM, Wolniak SM. 2013. Removal of retained introns regulates translation in the rapidly developing gametophyte of *Marsilea vestita*. *Developmental Cell* 24(5), 517–529.
12. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. 2010. The nucleolus under stress. *Molecular Cell* 40(2), 216–227.

13. Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoege C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA. 2009. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* 324, 1729–1732.
14. Brangwynne CP, Tompa P, Pappu RV. 2015. Polymer physics of intracellular phase transitions. *Nature Physics* 11(11), 899–904.
15. Braunschweig U, Barbosa-Morais NL, Pan Q, Nachman EN, Alipanahi B, Gonatopoulos-Pournatzis T, Frey B, Irimia M, Blencowe BJ. 2014. Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Research* 24(11), 1774–1786.
16. Broome HJ, Carrero ZI, Douglas HE, Hebert MD. 2013. Phosphorylation regulates coilin activity and RNA association. *Biology Open* 2(4), 407–415.
17. Brown R. 1828. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine Series* 2, 4(21), 161–173.
18. Buxbaum AR, Haimovich G, Singer RH. 2015. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 95–109.
19. Cajal SRy. 1903. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid* 2(7-8), 129–221.
20. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* 3(4), 285–298.
21. Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G. 1999. Gemin3. A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *Journal of Cell Biology* 147, 1181–1194.
22. Chen J i Wagner EJ. 2010. snRNA 3' end formation: the dawn of the Integrator complex. *Biochemical Society Transactions* 38, 1082–1087.
23. Chubb JR, Trcek T, Shenoy SM, Singer RH. 2006. Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Current Biology* 16, 1018–1025.
24. Cioce M i Lamond AI. 2005. Cajal bodies: A Long History of Discovery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 105–131.
25. Colas I, Darrier B, Arrieta M, Mittmann SU, Ramsay L, Sourdille P, Waugh R. 2017. Observation of extensive chromosome axis remodeling during the “diffuse-phase” of meiosis in large genome cereals. *Frontiers in Plant Science* 8, 1235.

26. Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
27. Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292(5523), 1863-1876.
28. Cremer T i Cremer M. 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a003889.
29. Cuenca-Bono B, García-Molinero V, Pascual-García P, Dopazo H, Llopis A, Vilardell J, Rodríguez-Navarro S. 2011. SUS1 introns are required for efficient mRNA nuclear export in yeast. *Nucleic Acids Research* 39(19), 8599–8611.
30. Dar RD, Razooky BS, Singh A, Trimeloni TV, McCollum JM, Cox CD, Simpson ML, Weinberger LS. 2012. Transcriptional burst frequency and burst size are equally modulated across the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109(43), 17454–17459.
31. Deryusheva S i Gall JG. 2004. Dynamics of coilin in Cajal bodies of the *Xenopus* germinal vesicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101(14), 4810–4814.
32. Egloff S i Murphy S. 2008. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends in Genetics* 24(6), 280–288.
33. Fefilova AS, Fonin AV, Vishnyakov IE, Kuznetsova IM, Turoverov KK. 2022. Stress-induced membraneless organelles in eukaryotes and prokaryotes: bird’s-eye view. *International Journal of Molecular Sciences* 23(9), 5010.
34. Fica SM. 2020. Cryo-EM snapshots of the human spliceosome reveal structural adaptations for splicing regulation. *Current Opinion in Structural Biology* 65, 139–148.
35. Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J. 2000. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 9, 849–858.
36. Fu XD i Ares M. 2014. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics* 15, 689–701.
37. Fuerst JA. 2010. Beyond prokaryotes and eukaryotes: planctomycetes and cell organization. *Nature Education* 3(9), 44.
38. Fujioka Y, Utsumi M, Ohba Y, Watanabe Y. 2007. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 48, 1243–1253.
39. Gallinari P, Marco SD, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. 2007. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research* 17, 195–211.

40. Galloway A i Cowling VH. 2019. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms* 1862(3), 270–279.
41. Gardner EJ, Nizami ZF, Talbot CC Jr, Gall JG. 2012. Stable intronic sequence RNA (sisRNA), a new class of noncoding RNA from the oocyte nucleus of *Xenopus tropicalis*. *Genes & Development* 26(22), 2550-2559.
42. Ge Y i Porse BT. 2013. The functional consequences of intron retention: alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression. *BioEssays* 36(3), 236-243.
43. Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. 2016. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics* 135(8), 851–867.
44. Girard C, Verheggen C, Neel H, Cammas A, Vagner S, Soret J, Bertrand E, Bordonné R. 2008. Characterization of a short isoform of human Tgs1 hypermethylase associating with small nucleolar ribonucleoprotein core proteins and produced by limited proteolytic processing. *Journal of Biological Chemistry* 283(4), 2060–2069.
45. Górka S, Kubiak D, Ciesińska M, Niedojadło K, Tyburski J, Niedojadło J. 2022. Function of Cajal bodies in nuclear RNA retention in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences* 23(14), 7568.
46. Grewal SI i Elgin SC. 2007. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399–406.
47. Hajheidari M, Koncz C, Eick D. 2013. Emerging roles for RNA polymerase II CTD in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 18(11), 633–643.
48. Hebert MD i Matera AG. 2000. Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Molecular Biology of the Cell* 11(12), 4159–4171.
49. Hebert MD, Szymczyk PW, Shpargel KB, Matera AG. 2001. Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes & Development* 15, 2720–2729.
50. Hillers KJ, Jantsch V, Martinez-Perez E, Yanowitz JL. 2017. Meiosis. *WormBook*, 1–43.
51. Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M. 2007. RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769, 358–374.
52. Hyjek M, Wojciechowska N, Rudzka M, Kołowerzo-Lubnau A, Smoliński DJ. 2015. Spatial regulation of cytoplasmic snRNP assembly at the cellular level. *Journal of Experimental Botany* 66 (22), 7019–7030.

53. Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. 2006. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Molecular Biology of the Cell* 17, 944–954.
54. Jimeno S, Rondón AG, Luna R, Aguilera A. 2002. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO Journal* 21(13), 3526–3535.
55. Jin X, Lee JE, Schaefer C, Luo X, Wollman AJM, Payne-Dwyer AL, Tian T, Zhang X, Chen X, Li Y, McLeish TCB, Leake MC, Bai F. 2021. Membraneless organelles formed by liquid-liquid phase separation increase bacterial fitness. *Science Advances* 7(43); eabh2929.
56. Jonik-Nowak B, Menneteau T, Fesquet D, Baldin V, Bonne-Andrea C, Méchali F, Fabre B, Boisguerin P, de Rossi S, Henriquet C, Pugnière M, Ducoux-Petit M, Burlet-Schiltz O, Lamond AI, Fort P, Boulon S, Bousquet MP, Coux O. 2018. PIP30/FAM192A is a novel regulator of the nuclear proteasome activator PA28γ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 115(28), 6477–6486.
57. Kataoka N. 2023. The nuclear cap-binding complex, a multitasking binding partner of RNA polymerase II transcripts. *Journal of Biochemistry* 175(1), 9–15.
58. Khyzha N, Ahmad K, Henikoff S. 2025. Profiling transcriptome composition and dynamics within nuclear compartments using SLAM-RT&Tag. *Molecular Cell* 85(7), 1366–1380.e4.
59. Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, Haupt S, Brown JWS, Taliany M. 2007. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO Journal* 26(8), 2169–2179.
60. Kołowerzo A, Smoliński DJ, Bednarska E. 2009. Poly(A) RNA – a new component of Cajal bodies. *Protoplasma* 236(1–4), 13–19.
61. Kołowerzo-Lubnau A, Niedojadło J, Świdziński M, Bednarska-Kozakiewicz E, Smoliński DJ. 2015. Transcriptional activity in diplotene larch microsporocytes, with emphasis on the diffuse stage. *PLOS ONE* 10, e0117337.
62. Lanfranco M, Vassallo N, Cauchi RJ. 2017. Spinal muscular atrophy: from defective chaperoning of snRNP assembly to neuromuscular dysfunction. *Frontiers in Molecular Biosciences* 4, 41.
63. Larson AG, Elnatan D, Keenen MM, Trnka MJ, Johnston JB, Burlingame AL, Agard DA, Redding S, Narlikar GJ. 2017. Liquid droplet formation by HP1α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* 547(7662), 236–240.
64. Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO Journal* 19(24), 6860–6869.

65. Lee Y i Rio DC. 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry* 84, 291–323.
66. Lemm I, Girard C, Kuhn AN, Watkins NJ, Schneider M, Bordonné R, Lührmann R. 2006. Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. *Molecular Biology of the Cell* 17(7), 3221–3231.
67. Levine JH, Lin Y, Elowitz MB. 2013. Functional roles of pulsing in genetic circuits. *Science* 342(6163), 1193–1200.
68. Li CF, Pontes O, El-Shami M, Henderson IR, Bernatavichute YV, Chan SW-L, Lagrange T, Pikaard CS, Jacobsen SE. 2006. An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126(1), 93–106.
69. Li CF, Henderson IR, Song L, Fedoroff N, Lagrange T, Jacobsen SE. 2008. Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 4(2), e27.
70. Li P, Banjade S, Cheng HC, Kim S, Chen B, Guo L, Llaguno M, Hollingsworth JV, King DS, Banani SF, Russo PS, Jiang QX, Nixon BT, Rosen MK. 2012. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* 483(7389), 336–340.
71. Liu J-L, Wu Z, Nizami Z, Deryusheva S, Rajendra TK, Beumer KJ, Gao H, Matera AG, Carroll D, Gall JG. 2009. Coilin is essential for Cajal body organization in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology of the Cell* 20(6), 1661–1670.
72. Logan MK, McLaurin DM, Hebert MD. 2020. Synergistic interactions between Cajal bodies and the miRNA processing machinery. *Molecular Biology of the Cell* 31(15), 1561–1569.
73. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ. 1998. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nature Genetics* 19, 63–66.
74. Love AJ, Yu C, Petukhova NV, Kalinina NO, Chen J, Taliansky ME. 2017. Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses. *RNA Biology* 14(6), 779–790.
75. Lykke-Andersen S i Jensen TH. 2015. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(11), 665–677.
76. Machyna M, Heyn P, Neugebauer KM. 2013. Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4(1), 17–34.
77. Machyna M, Kehr S, Straube K, Kappei D, Buchholz F, Butter F, Ule J, Hertel J, Stadler PF, Neugebauer KM. 2014. The coilin interactome identifies hundreds

- of small noncoding RNAs that traffic through Cajal bodies. *Molecular Cell* 56(3), 389–399.
78. Machyna M, Neugebauer KM, Staněk D. 2015. Coilin: the first 25 years. *RNA Biology* 12(6), 590–596.
 79. Majewska K, Wróblewska-Ankiewicz P, Rudzka M, Hyjek-Składanowska M, Gołębiewski M, Smoliński DJ, Kołowerzo-Lubnau A. 2021. Different patterns of mRNA nuclear retention during meiotic prophase in larch microsporocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 8501.
 80. Makarov V, Rakitina D, Protopopova A, Yaminsky I, Arutiunian A, Love AJ, Taliansky M, Kalinina N. 2013. Plant coilin: structural characteristics and RNA-binding properties. *PLoS One* 8(1), e53571.
 81. Mansisidor AR i Risca VI. 2022. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights. *Nucleus* 13(1), 236–276.
 82. Mao YS, Zhang B, Spector DL. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies, *Trends in Genetics*. 27(8), 295–306.
 83. Matera AG i Frey MR. 1998. Coiled bodies and gems: Janus or Gemini? *American Journal of Human Genetics* 63, 317–321.
 84. Matera AG i Wang Z. 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(2), 108–121.
 85. Medenbach A, Schreiner S, Liu S, Luhrmann R, Bindereif A. 2004. Human U4/U6 snRNP recycling factor p110: mutational analysis reveals function of TPR domain in recycling. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7392–7401.
 86. Meier UT. 2017. RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biology* 14(6), 693–700.
 87. Meister G, Bühler D, Pillai R, Lottspeich F, Fischer U. 2001. A multiprotein complex mediates ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nature Cell Biology* (3), 945–949.
 88. Molenaar C, Abdulle A, Gena A, Tanke HJ, Dirks RW. 2004. Poly(A)⁺ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *Journal of Cell Biology* 165, 191–202.
 89. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, Mittag T, Taylo JP. 2015. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell* 163(1), 123–133.
 90. Muñoz-Díaz E i Sáez-Vásquez J. 2022. Nuclear dynamics: formation of bodies and trafficking in plant nuclei. *Frontiers in Plant Science* 13, 984163.
 91. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T, Prasanth KV. 2012. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA* 18(8), 1487–1499.

92. Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Matera AG. 2002. SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Human Molecular Genetics* 11, 1785–1795.
93. Narayanan U, Achsel T, Lührmann R, Matera AG. 2004. Coupled *in vitro* import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Molecular Cell* 16, 223–234.
94. Naro C, Jolly A, Di Persio S, Bielli P, Setterblad N, Alberdi AJ, Vicini E, Geremia R, De la Grange P, Sette C. 2017. An orchestrated intron retention program in meiosis controls timely usage of transcripts during germ cell differentiation. *Developmental Cell* 41, 82–93.
95. Natalizio BJ i Wenthe SR. 2013. Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends in Cell Biology* 23, 365–373.
96. Neugebauer KM. 2019. Nascent RNA and the Coordination of Splicing with Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11, a032227.
97. Nilsen TW i Graveley BR. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463(7280), 457–463.
98. Nunes VS i Moretti NS. 2017. Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biology International* 41, 2–7.
99. Oesterreich FC, Herzelt L, Straube K, Hujer K, Howard J, Neugebauer KM. 2016. Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell* 165(2), 372–381.
100. Ohtani M. 2018. Plant snRNP biogenesis: a perspective from the nucleolus and Cajal bodies. *Frontiers in Plant Science* 8, 2184.
101. Ottens F, Gehring NH. 2016. Physiological and pathophysiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 468(6), 1013–28.
102. Owens JN i Molder M. 1971. Meiosis in conifers: prolonged pachytene and diffuse diplotene stages. *Canadian Journal of Botany* 49(11), 2061–2064.
103. Pánek J, Roithová A, Radivojević N, Sýkora M, Prusty AB, Huston N, Wan H, Pyle AM, Fischer U, Staněk D. 2023. The SMN complex drives structural changes in human snRNAs to enable snRNP assembly. *Nature Communications* 14, 6580.
104. Platani M, Goldberg I, Swedlow JR, Lamond AI. 2000. *In vivo* analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *Journal of Cell Biology* 151(7), 1561–1574.
105. Pontes O i Pikaard CS. 2008. siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Current Opinion in Genetics & Development* 18(2), 197–203.
106. Ponting CP. 1997. Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 51–52.

- 107.Price DH. 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* 20(8), 2629–2634.
- 108.Ran JH, Shen TT, Wu H, Gong X, Wang XQ. 2018. Phylogeny and evolutionary history of *Pinaceae* updated by transcriptomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 129, 106–116.
- 109.Rauch HB, Patrick TL, Klusman KM, Battistuzzi FU, Mei W, Brendel VP, Lal SK. 2014. Discovery and expression analysis of alternative splicing events conserved among plant SR proteins. *Molecular Biology and Evolution* 31(3), 605–613.
- 110.Reddy AS. 2007. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annual Review of Plant Biology* 58, 267–294.
- 111.Rekosh D i Hammarskjöld ML. 2018. Intron retention in viruses and cellular genes: detention, border controls and passports. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 9(3), e1470.
- 112.Riback JA, Katanski CD, Kear-Scott JL, Pilipenko EV, Rojek AE, Sosnick TR, Drummond DA. 2017 Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell* 168(6), 1028–1040.
- 113.Rudzka M. 2020. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów związana z retencją transkryptów na terenie jądra komórkowego [Rozprawa doktorska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika].
<https://www.biol.umk.pl/nauka/stopnie-i-tytuly/doktoraty/zakonczone-przewody-doktorskie-2/2020-2/>.
- 114.Rudzka M, Wróblewska-Ankiewicz P, Majewska K, Hyjek-Składanowska M, Gołębiewski M, Sikora M, Smoliński DJ, Kołowerzo-Lubnau A. 2022. Functional nuclear retention of pre-mRNA involving Cajal bodies during meiotic prophase in European larch (*Larix decidua*). *Plant Cell* 34(6), 2404–2423.
- 115.Ryabov EV, Raj SK, Robinson DJ, Oparka KJ. 2003. An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *Journal of Virology* 77(5), 3031–3040.
- 116.Sauterer RA, Feeney RJ, Zieve GW. 1988. Cytoplasmic assembly of snRNP particles from stored proteins and newly transcribed snRNAs in L929 mouse fibroblasts. *Experimental Cell Research* 176(2), 344–359.
- 117.Schlautmann LP i Gehring NH. 2020 A Day in the Life of the Exon Junction Complex. *Biomolecules* 10(6), 866.
- 118.Schoenberg DR i Maquat LE. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 13(4), 246–259.
- 119.Schwerk C i Schulze-Osthoff K. 2005. Regulation of Apoptosis by Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell* 19(1), 1–13.

120. Selenko P, Sprangers R, Stier G, Buhler D, Fischer U, Sattler M. 2001. SMN Tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nature Structural Biology* 8, 27–31.
121. Semashko MA, Rakitina DV, Gonzalez I, Canto T, Kalinina NO, Taliansky ME. 2012. Movement protein of hordeivirus interacts *in vitro* and *in vivo* with coilin, a major structural protein of Cajal bodies. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 442, 57–60.
122. Shaw J, Love AJ, Makarova SS, Kalinina NO, Harrison BD, Taliansky ME. 2014. Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa. *Nucleus* 5(1), 85–94.
123. Sheu-Gruttadauria J i MacRae IJ. 2018. Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC. *Cell*. 173(4), 946–957.
124. Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG, Hebert MD. 2003. Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *Journal of Cell Science* 116(2), 303–312.
125. Singh G, Pratt G, Yeo GW, Moore MJ. 2015. The clothes make the mRNA: past and present trends in mRNP fashion. *Annual Review of Biochemistry* 84, 325–354.
126. Sleeman JE, Ajuh P, Lamond AI. 2001. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *Journal of Cell Science* 114(24), 4407–4419.
127. Smith KP i Lawrence JB. 2000. Interactions of U2 gene loci and their nuclear transcripts with Cajal (coiled) bodies: evidence for PreU2 within Cajal bodies. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2987–2998.
128. Smoliński DJ, Niedojadło J, Noble A, Górka-Bryl A. 2007. Additional nucleoli and NOR activity during meiotic prophase I in larch (*Larix decidua* Mill.). *Protoplasma* 232, 109–120.
129. Smoliński DJ, Wróbel B, Noble A, Zienkiewicz A, Górka-Bryl A. 2011. Periodic expression of Sm proteins parallels formation of nuclear Cajal bodies and cytoplasmic snRNP-rich bodies. *Histochemistry and Cell Biology* 136, 527–541.
130. Smoliński DJ i Kołowerzo A. 2012. mRNA accumulation in the Cajal bodies of the diplotene larch microsporocyte. *Chromosoma* 121, 37–48.
131. Söding J, Zwicker D, Sohrabi-Jahromi S, Boehning M, Kirschbaum J. 2020. Mechanisms for active regulation of biomolecular condensates. *Trends in Cell Biology* 30(1), 4–14.

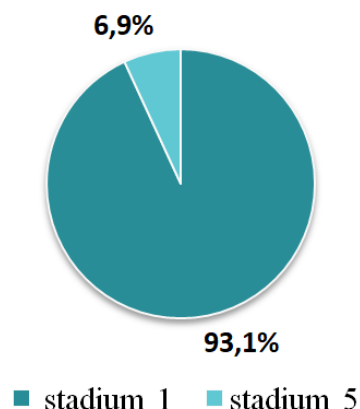
132. Staněk D, Rader SD, Klingauf M, Neugebauer KM. 2003. Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *Journal of Cell Biology* 160, 505–516.
133. Staněk D i Neugebauer KM. 2006. The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* 115, 343–54.
134. Staněk D, Přidalová-Hnilicová J, Novotný I, Huranová M, Blažíková M, Wen X, Sapra AK, Neugebauer KM. 2008. Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Molecular Biology of the Cell* 19(6), 2534–2543.
135. Staněk D. 2017. Cajal bodies and snRNPs—friends with benefits. *RNA Biology* 14(6), 671–679.
136. Staněk D. 2023. Coilin and Cajal bodies. *Nucleus* 14, 1.
137. Strom AR, Emelyanov AV, Mir M, Fyodorov DV, Darzacq X, Karpen GH. 2017. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* 547(7662), 241–245.
138. Strzelecka M, Trowitzsch S, Weber G, Lührmann R, Oates AC, Neugebauer KM. 2010. Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology* 17(4), 403–409.
139. Sun D, Wu R, Zheng J, Li P, Yu L. 2018. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Research* 28, 405–415.
140. Suter DM, Molina N, Gatfield D, Schneider K, Schibler U, Naef F. 2011. Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics. *Science* 332(6028), 472–474.
141. Suzuki T, Izumi H, Ohno M. 2010. Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *Journal of Cell Biology* 190, 603–612.
142. Talhouarne GJ i Gall JG. 2014. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of *Xenopus tropicalis* oocytes. *RNA* 20(9), 1476–1487.
143. Taliany ME, Love AJ, Kołowerzo-Lubnau A, Smoliński DJ. 2023. Cajal bodies: Evolutionarily conserved nuclear biomolecular condensates with properties unique to plants. *Plant Cell* 35(9), 3214–3235.
144. Taochy C, Yu A, Bouché N, Bouteiller N, Elmayan T, Dressel U, Carroll BJ, Vaucheret H. 2019. Post-transcriptional gene silencing triggers dispensable DNA methylation in gene body in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 47(17), 9104–9114.
145. Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. 2006. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Molecular Biology of the Cell* 17, 955–965.

146. Tucker KE, Berciano MT, Jacobs EY, LePage DF, Shpargel KB, Rossire JJ, Chan EK, Lafarga M, Conlon RA, Matera AG. 2001. Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *Journal of Cell Biology* 154, 293–307.
147. Turner BM. 2014. Nucleosome signalling; an evolving concept. *Biochimica et Biophysica Acta* 1839(8), 623–626.
148. Tworzydło W, Marek M, Kisiel S, Biliński SM. 2017. Meiosis, Balbiani body and early asymmetry of *Thermobia oocyte*. *Protoplasma* 254, 649–655.
149. Urban EA i Johnston RJ Jr. 2018. Buffering and amplifying transcriptional noise during cell fate specification. *Frontiers in Genetics* 9, 591.
150. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development* 20, 515–524.
151. Venteicher AS i Artandi SE. 2009. TCAB1: driving telomerase to Cajal bodies. *Cell Cycle* 8(9), 1329–1331.
152. Viveiros MM i De La Fuente R. 2019. Regulation of mammalian oocyte maturation. *The Ovary*, 165–180.
153. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136(4), 701–718.
154. Walker MP, Tian L, Matera AG. 2009. Reduced viability, fertility and fecundity in mice lacking the Cajal body marker protein, coilin. *PLoS One* 4(7), e6171.
155. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456(7221), 470–476.
156. Wang GZ, Hickey SL, Shi L, Huang HC, Nakashe P, Koike N, Tu BP, Takahashi JS, Konopka G. 2015. Cycling transcriptional networks optimize energy utilization on a genome scale. *Cell Reports* 13(9), 1868–1880.
157. Wang B, Zhang L, Dai T, Qin Z, Lu H, Zhang L, Zhou F. 2021. Liquid–liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6, 290.
158. Weber C, Nover L, Fauth M. 2008. Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant Journal* 56(4), 517–530.
159. Xu H, Pillai RS, Azzouz TN, Shpargel KB, Kambach C, Hebert MD, Schümperli D, Matera AG. 2005. The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma* 114(3), 155–166.
160. Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, Hasegawa J, Handa H. 1999. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41–51.

161. Yan C, Wan R, Shi Y. 2019. Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing through Structural Biology of the Spliceosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11(1), a032409.
162. Zaborowska J, Egloff S, Murphy S. 2016. The pol II CTD: New twists in the tail. *Nature Structural & Molecular Biology* 23(9), 771–777.
163. Zhang G, Wang Z, Du Z, Zhang H. 2018. mTOR Regulates Phase Separation of PGL Granules to Modulate Their Autophagic Degradation. *Cell*. 174(6), 1492-1506.
164. Zhao ZW, White MD, Bissiere S, Levi V, Plachta N. 2016. Quantitative imaging of mammalian transcriptional dynamics: from single cells to whole embryos. *BMC Biology* 14, 115.

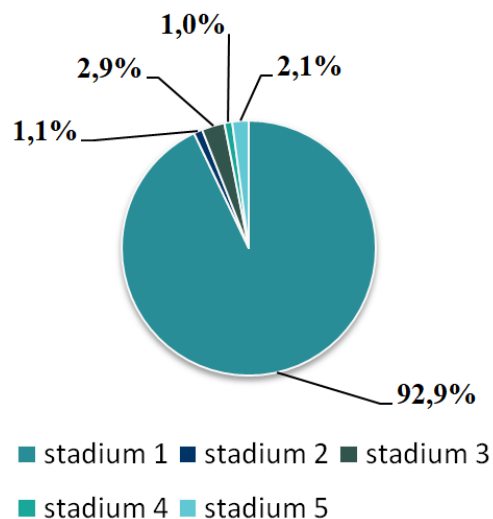
SUPLEMENTY

Stadium	Liczba komórek	Procentowy udział
1	469	93,1%
5	35	6,9 %
Suma	504	100 %



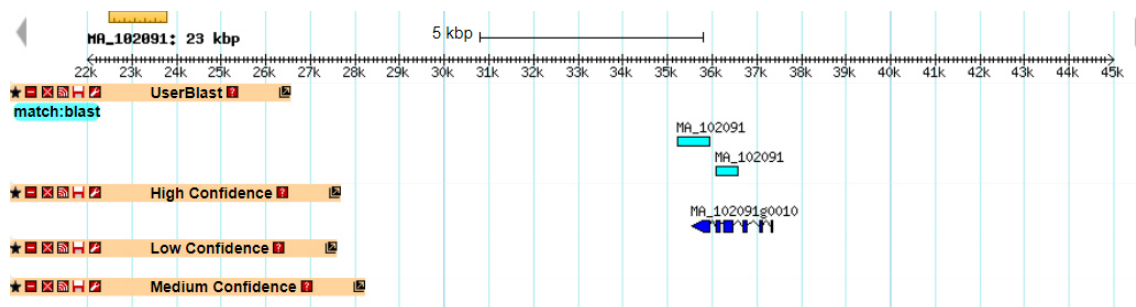
Supl. 1 Tabela z wynikami analizy statystycznej mikrosporocytów izolowanych z pojedynczego pąka kwiatowego (po lewej stronie) oraz diagram przedstawiający procentowy udział zidentyfikowanych stadiów. Analiza wykazała występowanie wysokiej synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów modrzewia w obrębie pojedynczego pąka (93,1%)

Stadium	Liczba komórek	Procentowy udział
1	663	92,9%
2	8	1,1 %
3	21	2,9 %
4	7	1 %
5	15	2,1 %
Total	714	100%



Supl. 2 Tabela z wynikami analizy statystycznej mikrosporocytów izolowanych z pojedynczej gałęzi (po lewej stronie) oraz diagram przedstawiający procentowy udział zidentyfikowanych stadiów. Analiza wykazała występowanie wysokiej synchroniczności rozwojowej mikrosporocytów modrzewia w obrębie pojedynczej gałęzi (92,9%).

pre-mRNA RS2Z32



Supl. 3 Wynik mapowania odczytu o numerze trinity DN1303_c0_g1_i5 i długości 1271 nt do genomu *Picea abies*. Wysoka zgodność sekwencji modrzewiowej z sekwencją *Picea abies* dla genu kodującego białko RS2Z32. Sekwencja wybranego odczytu zawierała w sobie sekwencję intronu 4 genu kodującego białko RS2Z32 u *Picea abies*. Wynik ten może wskazywać na obecność retencyjnego intronu 4 w obrębie transkryptu kodującego białko RS2Z32 u modrzewia europejskiego.

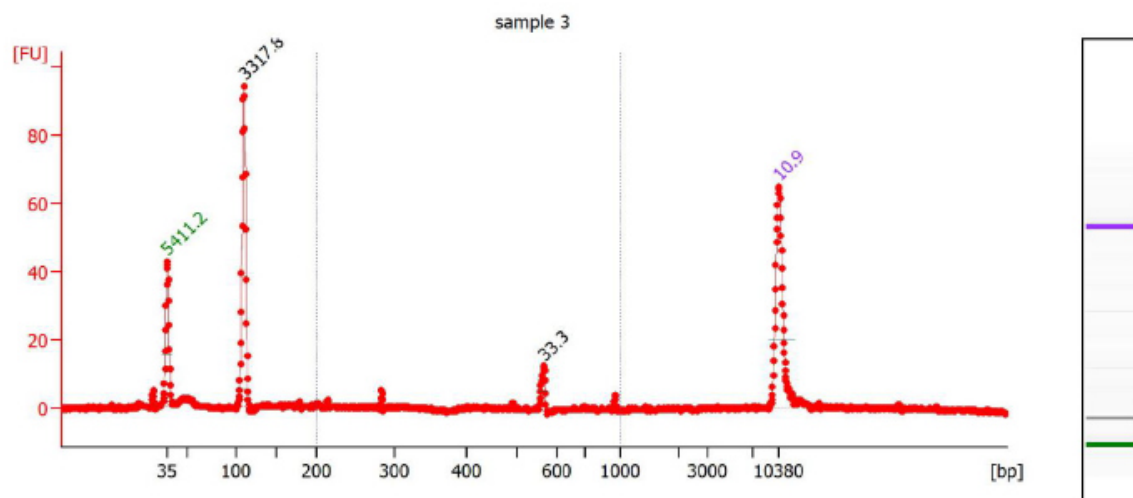
```
>TRINITY_DN1303_c0_g1_i5 len=1271 path=[1:0-102 8:103-304 9:305-405 10:406-1270]
AAATGACCTTTGCAAGTTATTTGTGGTTGTTATGCCTAATTTTGATCATTGTTGTATTCTCCAAGTGATTTATATAT
AATTTTTCTTACTTTACTTTATAGGGACCACGTGGAGCTGGTCGAAGTAGAGAATATCTAGGACGCGGCCCTCCAC
CTGGGTCTGGTCGGTGCTTCAATTGTGGGAATGATGGCCATTGGGCTCGAGACTGTAAAGCTGGGGATTGGAAAAA
TAAATGTTATCGTGTGGTGAGAGGGGTCAATTGAAAGAACTGTCAAACAGTCCAAAATCAACCGGCAGGTACG
TTTTAGTACTATTTTTCGGCCCGTGTCTGTGGGCTTCAACTTCCTGTGCACTAACAAAAATGCATTTTAAAAACAATT
AATATTTGTGGGCTTTAGGCGTGAGCGGTCTGCTTCAAGATCACCTTCTAGGTCGTTGTGCGCTCGTCGTGGAAGAA
GCCGCAGTGCAAGTTACAACAGCAGAAGTCGTAGCTACAGTCGAAGTCGATCCCCCAGATCACCGAGGGTGGATGG
ACGTACTGCAGTTCAGGATGAAAGAAAATCAAGAAGTCGAAGTTACAGCCACAGTCCTAGGAGGGCAAGGAGACAAA
GTCCAGCAATTGATGATCGTAGGAGCAGCAGTCCTTCAGCTGACAATGCAAGTGGCCAGAGGGGCAGTAGGTATAG
TCCGAAACGAAACACTCGCAGGAGTGACAGTCCACCTTTAGACACTGACCGTGTATCAAGGGACATTGCCAGTCCTC
GAGGAGACAGTCCTGGAAGGTCCCAAAGTCCAGCTGCAAACGGCAAGCCAGTCGTGATGTAAGCCAGATACTATG
AAAAATCAAAGCCCAAGCCCTATGAGAGATTCATCTGCTTTCAGAGAGAGCCCTGGAAGTCTTGAATTGCTATA
GGCATCTATTTGAAATATTGTTATTCCGGTAAAAGATATGTTTTTCATAAATTGGCTTTCAGTATGCCTTTTGAAC
CACAACAAAAGGATTAAACGATTTTAAGTTCAATTGTCTAAGAGCAATTTCTGCAATCAGATGAGAGTGCCGTTGTGG
CATGAAATTTCAAATTAATTGATCTAGGATTGCAGGTTGGATAATCATTTGAGATATGTTACACGACACACAATATGT
GAAATAACTCAAATGTTTATATTGTCAGAACCTCTTGTCTCTTAAATTTTTTCAGTTACTGGCTTTTATCATGGTCCA
CATTTAATCACACGATGCTGGATGTTAGCAGGG
```

Supl. 4 Sekwencja odczytu o numerze trinity DN1303_c0_g1_i5 z zachowanym intronem 4 (zaznaczony niebieskim kolorem). Na podstawie powyższej sekwencji zaprojektowane zostały sondy oraz primery niezbędne do wykonania reakcji FISH oraz przeprowadzenia zaplanowanych analiz molekularnych (q-PCR wraz z sekwencjonowaniem produktu reakcji).

```
CAGGTACGTTTTAGTACTATTTTTCGGCCCGTGTCTGTGGGCTTCAACTTCCTGTGCACTAACAAAAATGCATTTTAA
AAACAATTAATATTTGTGGGCTTTAGGCGTGAGCGGTCTGCTTCAAGATCACCTTCTAGGTCGTTGTGCGCTCGTCG
TGGAAGAAGCCGCAGTGCAAGTTACAACAGCAGAAGTCGTA
```

Supl. 5 Fragment sekwencji kodującej białko RS2Z32. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy niedojrzałej analizowanego transkryptu.

Immature Product: 111 bp



Overall Results for sample 3 : sample 3

Number of peaks found: 2 Corr. Area 1: 36.1
Noise: 0.4

Peak table for sample 3 : sample 3

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	110	241.63	3,317.8	
3	566	12.43	33.3	
4	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 3 : sample 3

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	36.1	18	439	44.2	76.44	343.2	Blue

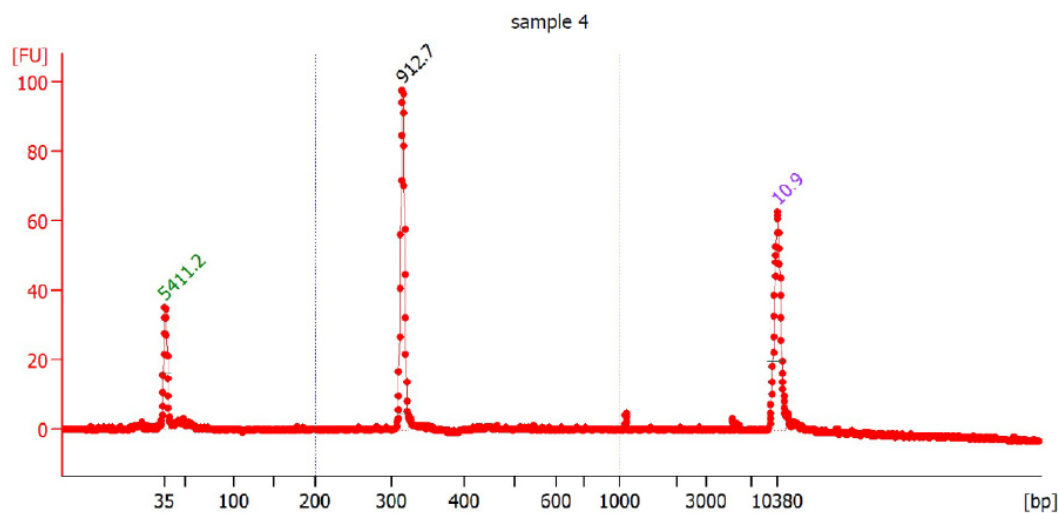
Supl. 6 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wynik dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla pre-mRNA kodującego białko RS2Z32. Uzyskano produkt długości 110 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 111 nt.

mRNA RS2Z32

TCAAAACAGTCCA**AAATCAACCGG**CAGGTACGTTTTAGTACTATTTTCGGCCCGTGTCTGTGGGCTTCAACTTCCT
GTGCACTAACAAAAATGCATTTTAAAAACAATTAATATTTGTGGGCTTTAG**CGGTGAGC**GGTCTGCTTCAAGATCACC
TTCTAGGTCGTTGTCGCGTCGTCGTGGAAGAAGCCGCGAGTGCAAGTTACAACAGCAGAAGTCGTAGCTACAGTCGAA
GTCGATCCCCCAGATCACCGAGGGTGGATGGACGTACTGCAGTTCAGGATGAAAGAAAATCAAGAAGTCGAAGTTAC
AGCCACAGTCCTAGGAGGGCAAGGAGACAAAGTCCAGCAATTGATGATCGTAGGAGCAGCAGTCCTTCAGCTGACAA
TGCAAGTGGCCAGAGGGGCAGTAGGTATAGTC**CGAAACGAAACACTCGCAGG**

Supl. 7 Fragment sekwencji kodującej białko RS2Z32. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy dojrzałej analizowanego transkryptu.

Mature product: 321 bp



Overall Results for sample 4 : sample 4

Number of peaks found: 1 Corr. Area 1: 128.5
Noise: 0.4

Peak table for sample 4 : sample 4

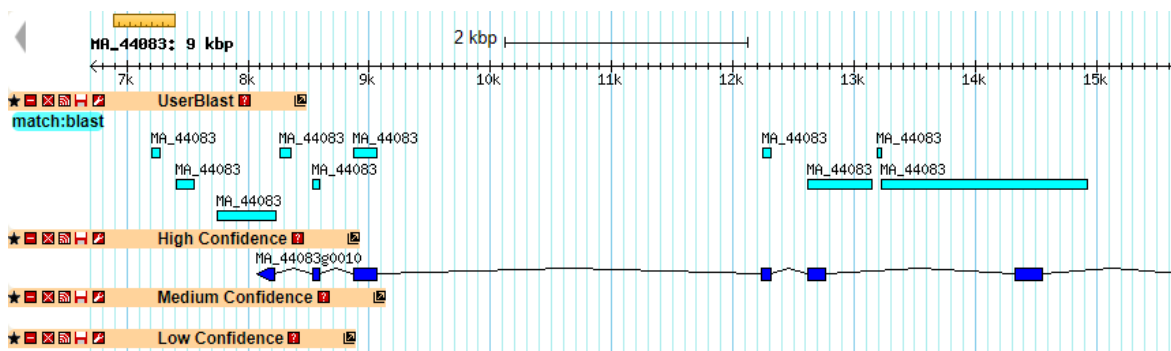
Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	314	189.20	912.7	
3	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 4 : sample 4

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	128.5	61	391	40.1	310.23	1,380.2	Blue

Supl. 8 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wyniki dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla mRNA kodującego białko RS2Z32. Uzyskano produkt długości 314 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 321 nt.

pre-mRNA THOC4



Supl. 9 Wynik mapowania odczytu o numerze trinity DN1414_c0_g1_i32 i długości 3604 nt do genomu *Picea abies*. Wysoka zgodność sekwencji modrzewiowej z sekwencją *Picea abies* dla genu kodującego białko THOC4. Sekwencja wybranego zawierała w sobie sekwencję intronu 3 genu kodującego białko THOC4 u *Picea abies*. Wynik ten może wskazywać na obecność retencyjnego intronu 3 w obrębie transkryptu kodującego białko RS2Z32 u modrzewia europejskiego.

```
>TRINITY_DN1414_c0_g1_i32 len=3604 path=[1:0-403 2:404-404 3:405-722 4:723-1426 5:1427-1463 7:1464-1807 8:1808-1834 9:1835-2378 10:2379-2785 11:2786-3219 13:3220-3603]
```

```
CGGATTACTGCGTTAATTTGGCAGTCTGAAGTTTTCTGGTCTACTATTCTTATTCCTTGCCGAAAGCATTTATTCAT
CCGATTTCTCTTTGGTTCGCCAATCCCGGCTGGGCTTCTGTTCAATTTATCGGTGCGGGAGCCTCAGGAGCCTCT
TATTCATCCTATTCTATCCTGCCCGCTTCTCCAGTCTTTATATCTCACACGCAACACTTTCTCAGCCATCTAGGGT
TCTGAAAAGAAAGGGGAGGGTTTCATTTCAATCATCTTCTTCGAGGGTTTGAAAAAGAGGGGAAGGGTTTCACCTCA
GCCATCTTCTTCTGGGTTTCTAAAAGAGTGGGGAGGGTTTCATCTCAGTCATCTTCTTCGCGGGTTTCAAAAAGAG
TGGGGAGGGTTTCATCTCAGTCATCTTCTTCGCGTTTCTGGGTTTTCTCAGCAGGTTACATACAGAGGCCAGAGCTT
TGGGCTTCGTTTCGTTTCGTTTCAAGAGGTCAAAGTTTCGATTCTTCATGGCGAGTTCCTTGGACATGTCACTAGAAG
ATCTCATAAAGAACAATAAGCCGTTTCAGTGGCGGAAGAGGCAGAGGAGGAAACAGAGGCAGAGGCAGAGGAGGAGG
AAGAGGAGGAGGAAGCAGAGGAGGCGATGGTGGTGGCCGCGGCCGCGAGGTCAACAGCTTAGGGTCAATGCCAA
TGCCCGGCTTCGCCATATACTATCGCCAAGGCAAGCTAACGGATACCAATTTTGTATGTTCAAAAATCTCGGGT
ATTAAATAGTTTGGTTCTTTTCATTGTATAGGAAAAAGAGACAAAGAAATAGCGATGGTGAGCTCTGGATCGAGCTCT
CCTAGGGAGGGAGTGTATCTTATGTTGCAAGTGTGAATCCACAAGAATAGAACGAGAATAGAACCTGTGATCACTGG
CTTGTTTTGTTTGGTAAGTGCCTGGGTTTTCTTCAAACCTCACCAGAGACCCTGCAATTTTTTGAAGCAACAAAGA
TTTGAGTTTATGAGACTTGCCGACGGTGTCTTGGTTCACTGGAGAGGTGGAAGGAGTATTAAGCCGTCCAGTAGGGT
TTATATCTCTCGCATCTTTGCCAATCGAATGGCTTCTCTGAGAAAGGGATGAAACCAAGTCCAATTCCTGGGCAATTT
TGTTGGAATAGTTACCCAGATCTGGCACCTAAGTTGAAAGGAGTTTGTGGTATGTGTTGCAGCCTTCTCATTCTCG
GGGTGTTTTTCTCTAAACAATTAAACAATGTTTATGAATTTACAAGTTTACTAGGATGGATATAAAAGATAAAAGAAC
GTGGTAGTTTGATCTGATTTGGTACTGCTGGTTGATCCGCAATGGAAGCCCCGTATCCTTTCAATAATAAACCTCG
TCAGAAACCCCGGAATCACTCTGCAGCTTTAATACACAAGAGGACTGAGTTGATTAGTATGGCTGATGCAGGAGAAT
GTAAGATAGCCGTAATTCAGTATGCTTCGGAATGCTGGTTACTTGGCGAGTACCACCCTTCTCACCCATCAAATAT
ACCCCATCGGAAACCTTCAAATCACTCCATTTGGATCTTTGCTTTCATGCAGGGTTTCAGGTCTTAGAGTGGATGC
AAATAAAAAATAATTGGTTCTCCTATGTGTTTCTGGTACATATGCGGTGGGCTTGGATCGTTTCTTCTTCGCAATTG
AGCAATTCGGGTGATGTCACAATCTGTTAGGAGTTGGAGTAGTAGATTCTTCTGACAAAGGGCCCGTATGGTTGACA
CTTTTACTCTGTTACACGGTCTGGAAGGAGGTATTTGTAAGTGAATTTGGGATGCGTAAGCATGGTGCCACCAT
```

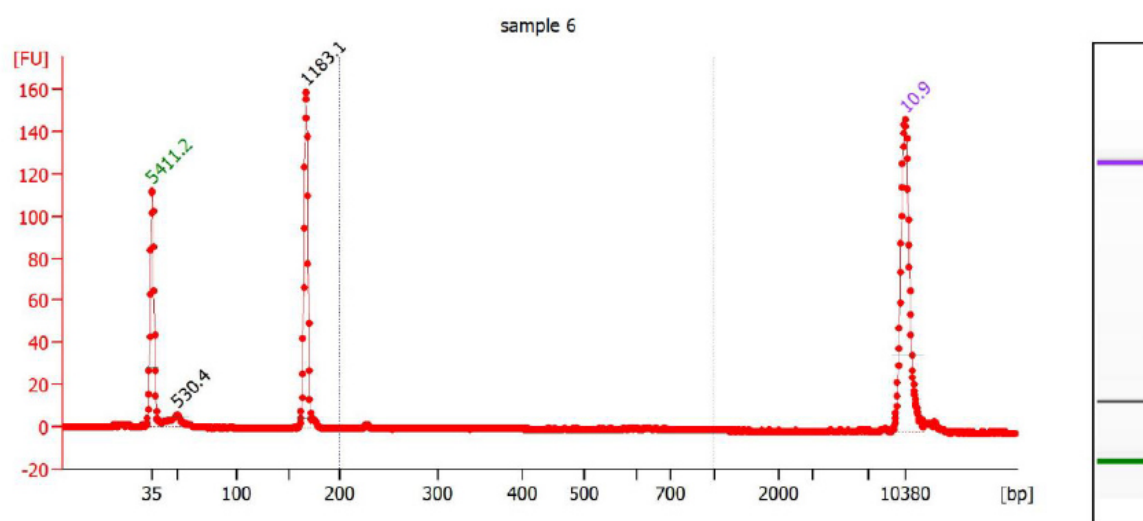

CGGCCTATACTCTCATCAGTAACAACAATTTTTATTTATTGATTTCTCTACGTCTTGTAAGAATTATTCATTATTCAAC
 GGGATTTTGTCTTTGCACCATTGTGGCACGTCATTAGCTATATTTTGCACCCTAGAATTTTATTTCTGCATTGTGAT
 TCCTAAAGTAGAACTCTGTCCGTGCATCCTTCTCTTTAGTTATTTAGTACATTCTGTTTGTAAGTTTGATTTGACAC
 ACCATTACTTACAGTTACACATTGCATTTCTCTTTGAATAAAATTCAGTCTGTGCATCATACTATGTGGTTGTACTGTA
 CATTATTTCTTTTTCTGTTATGAGTAGAATTCTGCCCGTGAACTTTATTCTTTTCTTTAATGGAATTTTGTCTAGGC
 TTCTATTCACTTTTTTCAATTGGCTTACACTAAGTTTTGTTTGTGCACTTCATATTTGAAATATTTTTGCCCAACTT
 CTAACGGTGTCTGCTTTGTGGGGCTACATATTTTTTGTGGAATGCCAAAGCAGTCGTTTCAGCCGTAACAAGGGTGTC
 ATATGGCAGCATGACATGTTTGAGGATAGCATGGCAGCTATAGGCATGCCTATAGGACTGGAGACTGGCACCAAATT
 GTACGTTTCAAATTTGGATTCTGGAGTATCCAATCAAGACATAAAGGAGCTTTTCTCAGAAGTCGGGGATCTCAAGA
 GCTGTTCTCTTATTATGATAGAAGTGGTCGATCAAATGGTACAGCAGAGGTAGTTTTTGTAAAGAAAAGTGATGCA
 GTTGCTGCTGTGAAGCGGTACAACAATGTCCAGCTTGATGGTAAACCGATGAAGATAGAATTGTTGGGACAGGTTT
 AAGTTTGCCCTTGTCTGCCCGTGTTAATGTTACTGGAACATCAGCTGGAAGAGGAAGGAGGACAGTTGTGATGACAC
 CGGGATTTACACGAGCAGCAGCAGATGCTTCAATGGAGCATAGGGGTGCGAATAGTAACCTGGAATCGTCGTCGTGG
 TCGGCGTTCGGTGGTCCAGGAAGAGGAGGACGTCGTGGTCTGGAAGAAGCCAGGTTCCAGCTAAGTCTGTTGCA
 GAACTTGACAAGGAGCTGGAAAATATCATACTGAGGCCATGCAGACATCTTAACTTATCTTCCGTTGATAGAAAGA
 TCATATATTTCAAGTTGTATTGCTGTTTCTAGAAAGATCCTCTATCATGTACTTGTGAAAGCTGTAAACCAAAAGATT
 CTTGAGAAAGATTCTCTCTATTGTTAAATATTTGCCTTGGCAATTGGGCACTTATCAATCAATGCATGATTTCTCAGC
 AGATCCAGTTATCATGCACATTTACTTCACCCATAAATTTATGGAAGTGTGCGGCCAATCTTATTTTGTAGTTTGGGA
 AGTGAGATTATCAAGGTGTTAGCAGCATTTGGCACTGATGTGCGTTTTCTTTTGGTATTATAGTCAGCTCTATGTT
 TCGGTGTGGCCAAAGCAAAACATGCTGCAAGCTTCAGAGGAGAGTCATTATAATAGTGTGTTGAAGGATGGGACAAGG
 GAGAGACTATCTGATTGACAGTCTCTTTGAGATCTGTGCTAGAATTGATGGGAATTATCAGCCAGATTAAATTTGCAT
 TTCGAAGATGCATTGAACACTACAGACAGATAGAGAAAGCTAATGCTTTTCTGTTTTTATGTATATTTATAGAGTT
 TAATCTTTAAGAGAATCATGCAGACCTTCCAAATTCTAA

Supl. 10 Sekwencja odczytu o numerze trinity DN1414_c0_g1z zachowanym intronem 3 (zaznaczony niebieskim kolorem). Na podstawie powyższej sekwencji zaprojektowane zostały sondy oraz primery niezbędne do wykonania reakcji FISH oraz przeprowadzenia zaplanowanych analiz molekularnych (q-PCR wraz z sekwencjonowaniem produktu reakcji)

GAGGTCAACAGCTTAGGGTCAATGCCAATGGCCGGCCTTCGCCATATACTATCGCCAAGGCAAGCTAACGGATACCC
 AATTTTGTATGTTCAAAAATCTCGGGTATTAAATAGTTTGGTCTTTTCATTGTATAGGAAAAAGAGACAAAGAAAT
 AGCGATGGTG

Supl. 11 Fragment sekwencji kodującej białko THOC4. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy niedojrzałej analizowanego transkryptu.

Immature Product: 165 bp



Overall Results for sample 6 : sample 6

Number of peaks found: 2 Corr. Area 1: 24.0
 Noise: 0.2

Peak table for sample 6 : sample 6

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	50	17.54	530.4	
3	167	130.28	1,183.1	
4	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 6 : sample 6

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	24.0	12	499	39.0	20.41	78.4	Blue

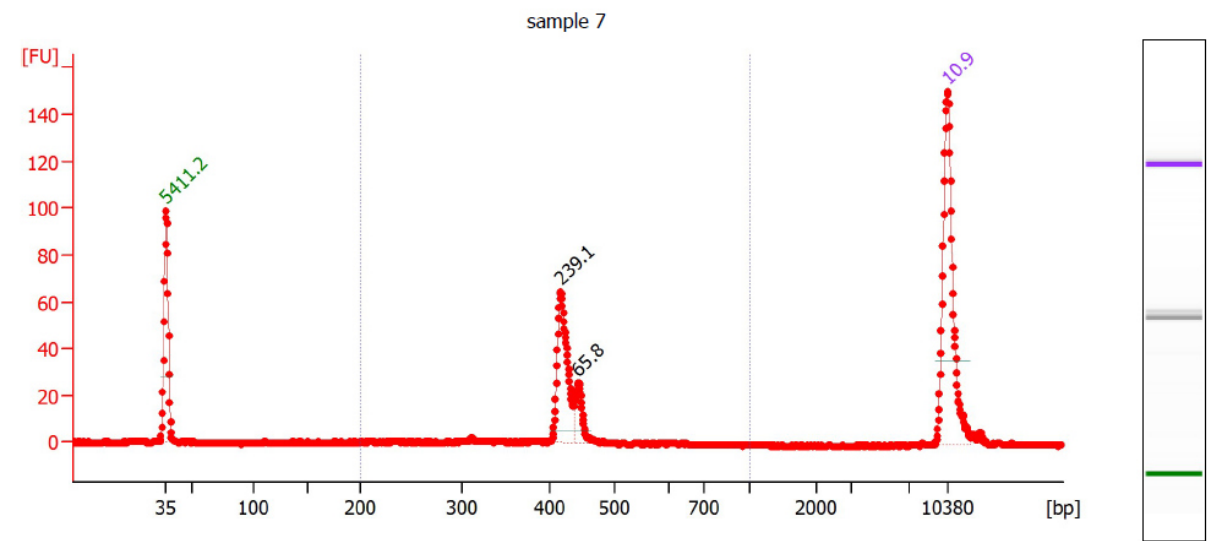
Supl. 12 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wyniki dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla pre-mRNA kodującego białko THOC4. Uzyskano produkt długości 167 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 165 nt.

mRNA THOC4

CTATCGCCAAGGCAAGCTAACGGATACCCAATTTTGTTCATGTTCAAAAATCTCGGGTATTAAATAGTTTGGTTCTTTT
CATTGTATAGGAAAAAGAGACAAAGAAATAGCGATGGTGAGCTCTGGATCGAGCTCTCCTAGGGAGGGACTGTATCT
TATGTTGCAAGTGTGAATCCACAAGAATAGAACGAGAATAGAACCTGTGATCACTGGCTTGTTTTGTTGGTAACTG
CCTGGGTTTTCTTCCAAACCTCACCAGAGACCCTGCAATTTTTTGAAGCAACAAAGATTGAGTTTATGAGACTTGC
CGACGGTGTCTTGGTTCACTGGAGAGGTCTGAAGGAGTATTAAGCCGTCCAGTAGGGTTTATATCTCTGCGATCTTTG
CCAATCGAATGGCTTCTCTGAGAAAGGGATGAAACCAAGTCCAATTCCTGGGCAATTTTGTGGAATAGTTACCCCA
GATCTGGCACCTAAGTTGAAAGGAGTTTGTGGTATGTGTTGCAGCCTTCTCATTCTCGGGGTGTTTTCTCTAAACA
ATTAACAATGTTTATGAATTTACAAGTTTACTAGGATGGATATAAAAGATAAAAAGAACGTGGTAGTTTGATCTGAT
TTGGTACTGCTGGTTGATCCGCAATGGAAGCCCCGTATCCTTTCAATAATAAACCTCGTCAGAAACCCCGGAATCA
CTCTGCAGCTTTAATACACAAGAGGACTGAGTTGATTAGTATGGCTGATGCAGGAGAATGTAAGATAGCCGTAATTC
AGTATGCTTCGGAATGCTGGTTACTTGGCGAGTACCACCCTTTCTACCCATCAAACCTATACCCCATCGGAAACCTT
CCAAATCACTCCATTTGGATCTTTGCTTTCATGCAGGGTTCAGGTCTTAGAGTGGATGCAAATAAAAATAATTGGTTC
TCCTATGTGTTTCTGGTACATATGCGGTGGGCTTGGATCGTTTCCTTTCTTCGCAATTGAGCAATTCGGGTGATGTC
ACAATCTGTTAGGAGTTGGAGTAGTAGATTCTTCTGACAAAGGGCCCGTATGGTTGACACTTTTACTCTGTTACACG
GTCCTGGAAGGAGGTATTTGTAAGTGAATTTTGGGATGCGTAAGCATGGTGCCACCATCGGCCTATACTCTCATCA
GTAACAACAATTTTTATTTATTGATTTCTCTACGTCTGTAGAATTATCACTTATTCAACGGGATTTGTCTTTGCAC
CATTGTGGCACGTCATTAGCTATATTTGCACCACTAGAATTTTATTTCTGCATTGTGATTCTTAAAGTAGAACTCTG
TCCGTGCATCCTTCTCTTAGTTATTTAGTACATTCTGTTTGTAGAGTTTGATTTGACACACCATTACTTACAGTTACA
CATTGCATTTCTCTTGAATAAAATTCAGTCTGTGCATCACTATGTGGTTGTACTGTACATTATTTCTTTTCTGTT
ATGAGTAGAATTCTGCCGTGAACCTTATTCTTTTCTTTAATGGAATTTTGTCTAGGCTTCTATTCACTTTTTTTCA
ATTGGCTTACACTAAGTTTTGTTTGTGCACTTCATATTTGAAATATTTTGTCCCAACTTCTAACGGTGTCTGCTTTG
TGGGGCTACATATTTTTGTGGAATGCCAAAGCAGTCGTTACGCGTAACAAGGGTGTCAATATGGCAGCATGACATG
TTTGAGGATAGCATGGCAGCTATAGGCATGCCTATAGGACTGGAGACTGGCACCAAATTGTACGTTTCAAATTTGGA
TTCTGGAGTATCCAATCAAGACATAAAGGAGCTTTTCTCAGAAGTCGGGGATCTCAAGAGCTGTTCTCTTCATTATGA
TAGAAGTGGTCGATCAAATGGTACAGCAGAGGTAGTTTTTGTAAAGAAAAGTGATGCAGTTGCTGCTGTGAAGCGGT
ACAACAATGTCCAGCTTGATGGTAAACCGATGAAGATAGAAGTTGTTGGGACAGGTTTAAGTTTGCCCTGTCTGCC
CGTGTTAATGTTACTGGAACATCAGCTGGAAGAGGAAGGAGGAC

Supl. 13 Fragment sekwencji kodującej białko THOC4. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy dojrzałej analizowanego transkryptu.

Immature Product: 406 nt



Overall Results for sample 7 : sample 7

Number of peaks found: 2 Corr. Area 1: 139.7
Noise: 0.2

Peak table for sample 7 : sample 7

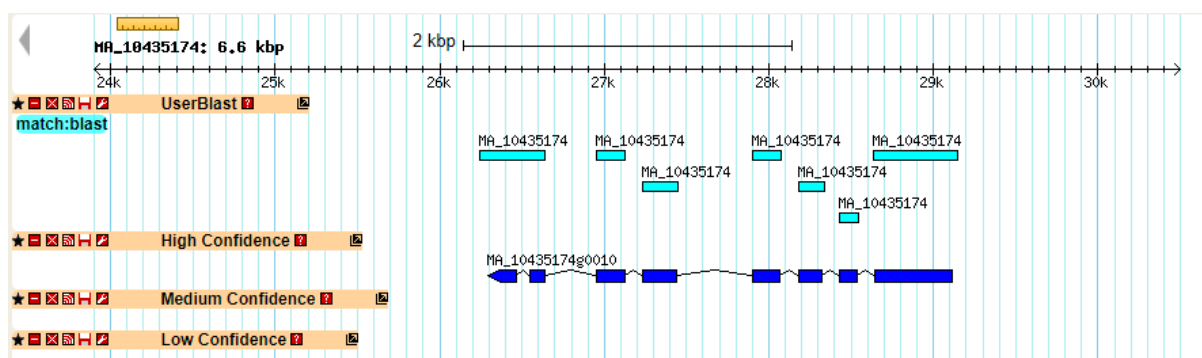
Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	416	65.70	239.1	
3	443	19.23	65.8	
4	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 7 : sample 7

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	139.7	85	415	13.2	107.95	409.2	Blue

Supl. 14 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wyniki dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla mRNA kodującego białko THOC4. Uzyskano produkt długości 416 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 406 nt.

pre-mRNA hnRNP Q-like isoform X1



Supl. 15 Wynik mapowania odczytu o numerze trinity DN88_c0_g1_i2 i długości 2293 nt do genomu *Picea abies*. Wysoka zgodność sekwencji modrzewiowej z sekwencją *Picea abies* dla genu kodującego białko hnRNP Q-like isoform X1 u *Picea abies*. Sekwencja wybranego odczytu zawierała w sobie sekwencję intronu 7 genu kodującego białko hnRNP Q-like isoform X1. Wynik ten może wskazywać na obecność retencyjnego intronu 4 w obrębie transkryptu kodującego białko hnRNP Q-like isoform X1 u modrzewia europejskiego.

>TRINITY_DN88_c0_g1_i2 len=2293 path=[0:0-278 2:279-279 3:280-290 4:291-1663 5:1664-1748 6:1749-2292]

CTTCAATAAAAGAGGGAAAAAGAAACAACTTGCCATGTCGGTGCCAAATTGAAAGGTTAAGTTTGGTATGGGTTGG
GTATAAGAAGATAAAGGCGCTTAGGGTTTGAGATATTGAAATTATTTTTATAATTTTCGAGATCTAAATCTTATAAAACA
AGGCCTTCGGAATCATCAGGCATTTTCAGGAAGTGCAATTCGTAGTCTCTTCTTATATATTCTGCCAATACGTCGC
TGGATCGTATCCGAGGGCATCTGCTGTGTTTCGGAGCTCATAACTGGTGGCATTTCAGGCAGCAGACAAGAAGATTGA
GACAATGCAGGATACCAGAGGATCTGCTGAAGATTTGCATGATGAGCGTGATGAAGAGCAAGTTGATCTTGATGGTG
ATGAAGAAGAGCCAGAAGAAATAATGGACGAGGAAGCAGAGGATGAGGGAGATGTTGAAGAGGAAGAGAGAAATGA
TGGTCAAGAAGGCCTTGATCTTGATCTAGCAGAGGATGAAGGATCTGGTTCACAGGATGAACACGAAGCTGAGCAAG
ATGCAAATGTGTCAAATGTGGACCCTGAAAAATTATCTGAAGATGATGCCAATAATGATACTGTAGAGGATGCCCTGC
CTACAGAAGGCAATGGCGAGAAGGCTGATAAGGATAAAGAAGAGTGTAATGATGAGGAATTGTTAGCACGGCCTCCA
CATGGTACAGAAGTCTTTGTAGGTAATCTACCCCGGAATATCACCAAGGAAGATTTAACTAGTCTTTGCGAGCAGCAT
GGAGAGGTTTCTGAGGTTAATATAAAACGGGAGGCAAGCAAGTTAGAATATGCATTTGTTACATTCACAACCAAGGA
GAGTGCCAAGAAGGCCATTGAGACATTGAATGGTTTTGAGTTTAAGGATAAGAAATTAAGAGTATCGGAATCCCAAC
CAAAAAATCGGCTTTTCTTGTAATATCCCATCAAATTTGAAAGAAGAGGACCTAACAAAAGTTGTCTCTGAGCAAG
GTCCTGGATTTCAACATTTGGAGTTGATAAAGGATCCAAAAGATTCAACAAGGAATCGTGGTTTTGCCTTTGTTGAAT
ACTACAACAAAGGCTGTGCCGAAAAGGCAATGAAAAATATGATACATTCAAAATTCAGTTGGACGACAAGGTCATAA
CAGTTAAATGGGCAACCAGTCAGCGTAGTTCATCCGAGGAGGTCAAGTCTGTTTATGTGCGTAATTTGCCGAGAAT
GTGACAGAAGAGCAACTAAAAGAACTTTTTGGTGCAGATGGTGAAGTCACTAAAGTCGTCTTATTGGAACAAAAGCC
TGGGCAGCCAAAGCGTGATTTTGGCTTTGTTCAATATGCTGATCATTCCAGTGCCATAAAAGCTATTGAAAAACAGA
GAAATACGTTCTTGAAGATCGGGAGCTGTCGGTCTCTTTAGCAAGACCTTTGAGTGATAAGAAGCCCCAACTATGG
CAAACCTACTTCTTTTCAGAGGCCTCTGTTTTCAAATTTTCAGCCTCAAGCTGGGTATGGTTACAATCCAAACATGT
ATGGTTTTGGCTCCATGGGCTATACTCAGCCTGTCACTATGGAAGAGGCCCCACACCTGAAGGCATGACGATGGTA
CCCATGATACTTCAGATGGGCGTGTTGGATATGTATTGTAAGTACTTTTACTTATTTTCATGTTTTCCCTCTGTCTTA
CAGACAAACACTGTTTCTTGAAATTTATTTCTCTTTGTTGATCAGGCAACAACCAGGGAATGGGGTAGGAGGATCTG
CCCCATACAGAGCAGAAGGGTCTGCTTCTTATGGAGGGCGGTCTACATCGTATAGATCAAGTAGAACCGGTTACAGGC
AGTAGTAGGCATGGTGAAGAAATCTGGTAGTGGGGCAGTCGGCGTTATAATCCCTATTAGTGTCTGTCAAATA

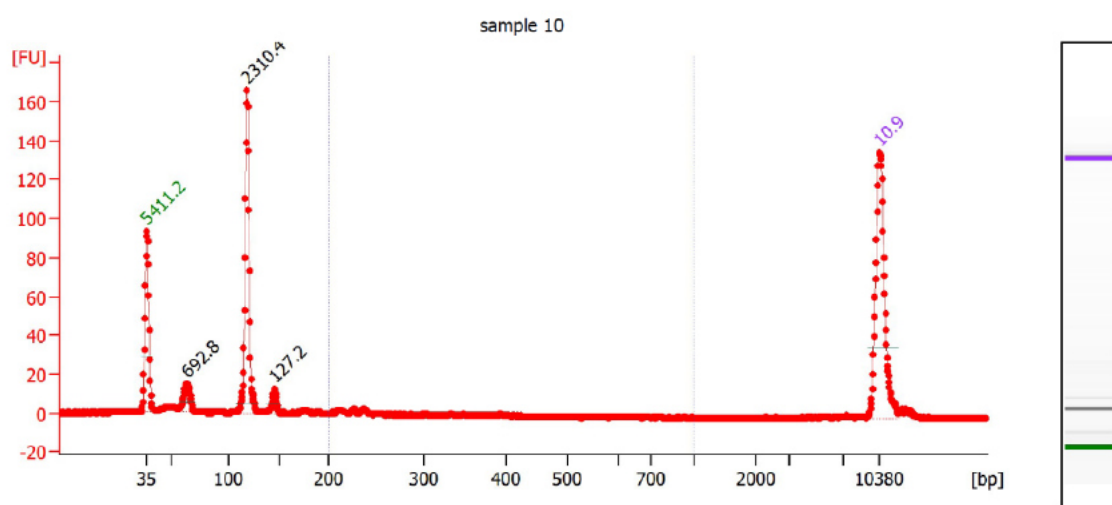
```
TGTTTTTAACATACCAGGACAATGATGGTAGGTTTAGAACAACCCCTATTAGTGTTCTGTCAAATTTTTTTTAAACATA  
CCAGGACAATGATAGGTTTATAACACCTTTGTGAGAGCTGATTAACAATGTCTTTATTTTTTATGGAGATCTTTGTAG  
CCTTTGATAATTTGAATGAGCTGCTGGATGGTCAAGTATACCATCATTTTCAATTTTGCTATTATTGATCGTGTTATC  
CACCGGATTTTCATTGTATTGCCAGCATCTAATATTGGCCGGTACATCAGCTTTAGTATGGAGATATTTTCGTCAATT  
GTTCTTGACATTTTCAGTTCTTGTATTCTAGGATTCTCCAGGTGGG
```

Supl. 16 Sekwencja odczytu o numerze trinity DN88_c0_g1_i2 z zachowanym intronem 7 (zaznaczony niebieskim kolorem). Na podstawie powyższej sekwencji zaprojektowane zostały sondy oraz primery niezbędne do wykonania reakcji FISH oraz przeprowadzenia zaplanowanych analiz molekularnych (q-PCR wraz z sekwencjonowaniem produktu reakcji).

```
AGATGGGCGTGTTGGATATGTATTGTAAGTACTTTTACTTATTTTCATGTTTTCCCTCTGTCTTACAGACAAACACTGT  
TTCTTGAAATTTATTCTCTTTGTTGATCAGGCAACAAC
```

Supl. 17 Fragment sekwencji kodującej białko hnRNP Q-like isoform X1. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy niedojrzałego analizowanego transkryptu.

Immature Product: 117 bp



Overall Results for sample 10 : sample 10

Number of peaks found: 3 Corr. Area 1: 24.6
 Noise: 0.3

Peak table for sample 10 : sample 10

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	64	29.14	692.8	
3	118	179.55	2,310.4	
4	145	12.21	127.2	
5	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 10 : sample 10

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	24.6	9	314	42.2	24.66	138.5	Blue

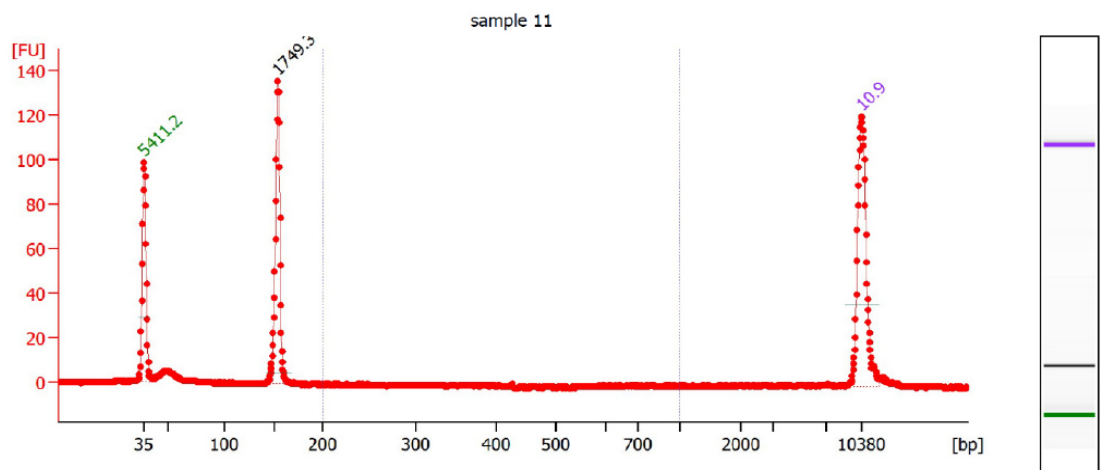
Supl. 18 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wyniki dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla mRNA kodującego białko hnRNP Q-like isoform X1. Uzyskano produkt długości 118 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 117 nt.

mRNA hnRNP Q-like isoform X1

GGGCGTGTGGATATGTATTGTAAGTACTTTTACTTATTTTCATGTTTCCCTCTGTCTTACAGACAAACACTGTTTCT
TGAAATTTATTTCTCTTTGTTGATCAGGCAACAACCAGGGAATGGGGTAGGAGGATCTGCCCCATACAGAGCAGAAG
GGTCTGCTTCTTATGGAGGGCGGTCTACATCGTATAGATCAAGTAGAACCGGTTCAGGCAGTAGTAGGCATGGTGG

Supl. 19 Fragment sekwencji kodującej białko hnRNP Q-like isoform X1. Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy dojrzałej analizowanego transkryptu.

Mature product: 146 bp



Overall Results for sample 11 : sample 11

Number of peaks found: 1 Corr. Area 1: 1.9
Noise: 0.3

Peak table for sample 11 : sample 11

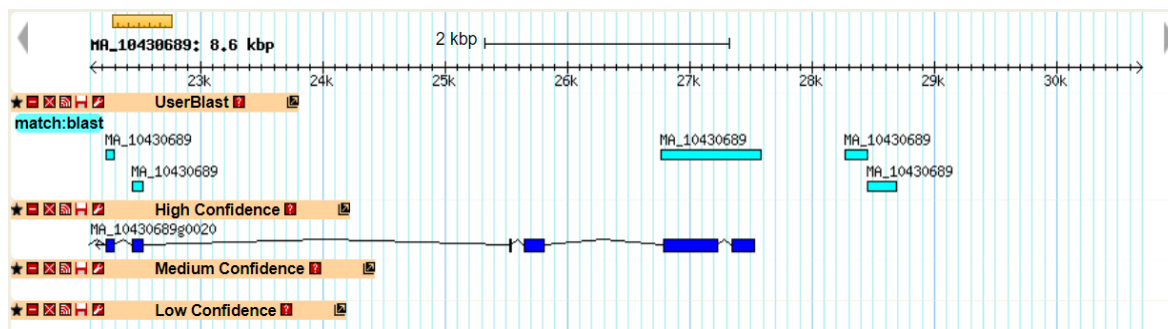
Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	154	177.73	1,749.3	
3	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 11 : sample 11

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	1.9	1	725	24.2	1.75	4.0	

Supl. 20 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wyniki dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla mRNA kodującego białko hnRNP Q-like isoform X1. Uzyskano produkt długości 154 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 146 nt.

pre-mRNA RBM39



Supl. 21 Wynik mapowania odczytu o numerze trinity DN1262_c0_g1_i1 i długości 2792 nt do genomu *Picea abies*. Wysoka zgodność sekwencji modrzewiowej z sekwencją *Picea abies* dla genu kodującego białko RBM39 u *Picea abies*. Sekwencja wybranego odczytu zawierała w sobie sekwencję intronu 1 genu kodującego białko RBM39. Wynik ten może wskazywać na obecność retencyjnego intronu 1 w obrębie transkryptu kodującego białko RBM39 u modrzewia europejskiego.

```
>TRINITY_DN1262_c0_g1_i1 len=2792 path=[1:0-1199 2:1200-2791]
```

```
GGGATTTACCTGCTACTGACGGTGAATGCGGTCTTCGCGGACGGTCTGCGCTGTTATGTGCCCTGCTGTTAATC
GGGTCGGAACGGATTTGATCGATGGATTTGAGAATTTAGTGAGAGGGAATTGTGCAGAGGTAGGAAAGGGCAAGG
AGATCTAAATACAGAGATCGCTCGGGCAAGCGTGGCGTTTGTGGCTGCTGGATCCCTCGCCACCTCCTCCTCCTCCA
TCATTGCGAGACCGATTGTCTAGCGCTTTTGGCGATACAAAACCCATACAAACAGCTTTTAGGGTTTCAGCATTTT
TTTACGCGTTTCCAGTTCGAAAACCCGAAAGGGTTGAATCAAGCACAAAGTAGCTTTTGTGGCTTGACAACCACTT
ACTATCGATGGATTTTGACGAGTACGATTATTTGGAAAAGACCGTGGAATCCAGAAGAAAATGGCAGGCCAGGTG
ATACGTTGGATGAAAAGATAGAAGTAAAGCAGCTCCAAACGCAGGAGCGATGAGGATGGCCATGGTGTGAGCAC
CGGTCCAAAAGGGCAAGGTCTGAGGAAGAAACAAGAGACAGGAGTGATAGAGGGGGGACGCGGTAAGGGCTTCTC
GTGACAGGGGAGAGCATGATAGGTCCAGAAGAGGAACCTCACACCATCGGTCTTCTCCGAGTACAGGTCCAGGGA
TTTGGATAGGGTTGAAAAGGACAGGTACAGAAGCAGTAGAGAGCGTCATGAAAGAGGCTCTCGTGACGGAGAAAGG
GATCATGACAGGGAGCGGTTCGAAAGAAATGGGAGAGATAAAGATCGGAAAGACTGGAAGAGACCGGGAACGAG
ACAAAATTAGGGATCGTGACCGTGAAAGCGAAAAGGAGAGGGAGAGGGAGATTGAGAAGGAGAAGGAGAGGTCCCG
TCGAAGCAGGAGCCGTTCTGAGCGACGCCGTAGTGTGAACGTCATCGTAGTGAACGGGAGAAAGAACGGGCTGAG
CGAGAGAAAAGCAAGGATAGATTGAAGGAAAAGAGAGAGAAAAGGGAGATCAGTGAGAAAGACAACCGGCGATTCAA
AGAAAGAAAGGAAGAAGCTGCAGAACCAAGCTGACCCAGAGCGGGATCAAAGGACAGTGTTTGCCTACCAGATAT
GCTTGAAGGCAGATGAAAGGGACGTATATGAGTTTTCTCAAGAGCTGGAAGGTACGTGATGTGAGGCTTATAATG
GATCGCAATTCCAGGCGGTCAAAGGTTGGGTACATTGAGTTTTATGATGCCATGTCAGTTCCAATGGCAATAGC
ATTATCTGGTCAGCTGCTGCTTGGTCAGCCTGTAATGGTAAAACCTTCAGAGGCGGAAAAAAATCTAGTCCAATCAA
ATGTTGCTGGAGCCATTGGAGCCGAGGTGGTTTTATTGGGCCCTATTCTGGTGGAGCCAGAAGATTGTATGTTGG
TAATCTACATTTCAACATAACAGAGGATCAGCTTCGGCAGGTGTTTGAAGCCATTTGGTGCTGTTGAGCTTGTCAATT
GCCAAGTATCCAGAGACTGGCCAGTGCAAGGGTTTTGGATTTGTTCAATTTACAAAACCTCGAAGATGCTCGAGCTG
CACAGAACCTGAATGGACAGCTGGAATTTGCTGGTCAATCATAAAGGTTTCAGCAGTGCTGATCAAGTTGGAATG
CAGGAGTTTGGGGCTAATGCTGCCGATTTTATGATGATGATGGAGGTGGCATATCTCTTAATGCTCGTTCTAGAGC
TATTCTTATGCAAAAATTGGACAGGAGTGGTATAGCTACGAGTGGTGTGTTTCAAGTGGCCCTGTGCCCTAGCTA
ATCCAATTTGGGCTCACAGGGCTACAGTTCTGGTATGCCTTCTGCAGTAGCACCTATTGTTCTTCTCTTGGGA
CCAATACAATCCCTGGCTATATGGGGTTACCTGCGCTGCAGTTGCTGCCCCAGTTGTGGATCCTATTGGTCTCTC
```

```

AAGTGACTGTCTGTTGCTTAAAAACATGTTTGATCCAAATAATGAGACTGAACCTGATTTTGATTTGGATATTAAAGA
GGATGTGCAAGATGAATGCTCCAAATTTGGTGCAGTGAAGCACATATTTGTGGACAAGCATAGTGCAGGACATGTCT
ACCTGCGTTTTGATAGTGCAACATCTGCAATTGGTGCACAGCGTGCTCTTCATGGCAGATGGTTTGCTGGAAAAATG
ATTACAGCAACATTCATGACGCCTTACACCTATGAGGCAAAATTTCCCGACAGCAAATGAACTTCTACAGAAATGTCT
TTGGGAGATGCATATTTAGATTAGTTTTACAAAAATTAAGATCAATTGCTGGTCTCGTGGGATTGCATAATGAGAAT
ACAAATTCACGGTTTTTTTTGGTGACCAAGAAGCATGTATGAACCAGCCAAGTTATTCTGGATGTACAATCGGGACTA
GCTTGCCTCCTGTTGATTTTGGTGGGAGATTTATTCTTTTACTTGCCTGAACTTGGGCATCCTTAGCTACCTTGTGTA
TATTTTTATTAATTTTCCTATTTCTGTAAATTTGGACTAGTATTTAGTTTGCTCAATACAGTTGGTCTTTAAACAAACG
ATTGGAGGAACATGCTACCTAATGCGGCAGCTACCAGCGTCTGAATACTTCTTGGCATCCATTGTTACAAGGAAGCA
TACAAATTGGTCGTGTATCTTATTTGATGGATTTTTTTCATAAAAAGATTTGGATGTCAGAAATTTGTTGCATTTATGG
CATGTTTAATGAATCTTTC

```

Supl. 22 Sekwencja odczytu o numerze trinity DN1262_c0_g1_i1 z zachowanym intronem 1 (zaznaczony niebieskim kolorem). Na podstawie powyższej sekwencji zaprojektowane zostały sondy oraz primery niezbędne do wykonania reakcji FISH oraz przeprowadzenia zaplanowanych analiz molekularnych (q-PCR wraz z sekwencjonowaniem produktu reakcji).

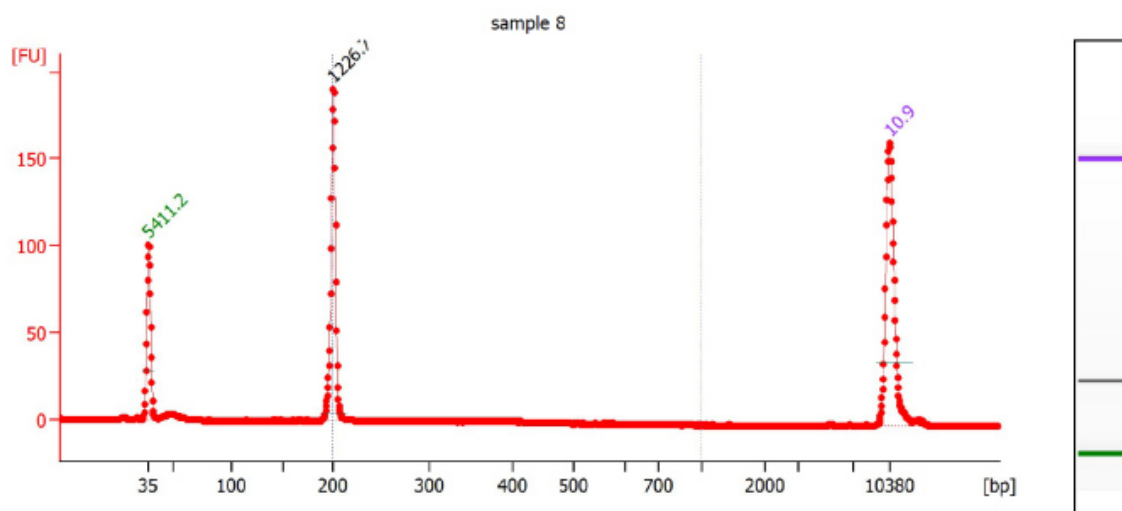
```

GATAGGTCCAGAAGAGGAACTTCACACCATCGGTCTTCTCCGGAGTACAGGTCCAGGGATTTGGATAGGGTTGAAAA
GGACAGGTACAGAAGCAGTAGAGAGCGTCATGAAAGAGGCTCTCGTGACGGAGAAAGGGATCATGACAGGGAGCGG
TCGGAAAGAAATGGGAGAGATAAAGATCGGGAAAGACTG

```

Supl. 23 Fragment sekwencji kodującej białko RBM39 Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy niedojrzałej analizowanego transkryptu.

Immature Product: 192 bp



Overall Results for sample 8 : sample 8

Number of peaks found: 1 Corr. Area 1: 123.9
Noise: 0.2

Peak table for sample 8 : sample 8

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	200	162.17	1,226.7	
3	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 8 : sample 8

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	123.9	61	212	18.4	119.41	875.2	Blue

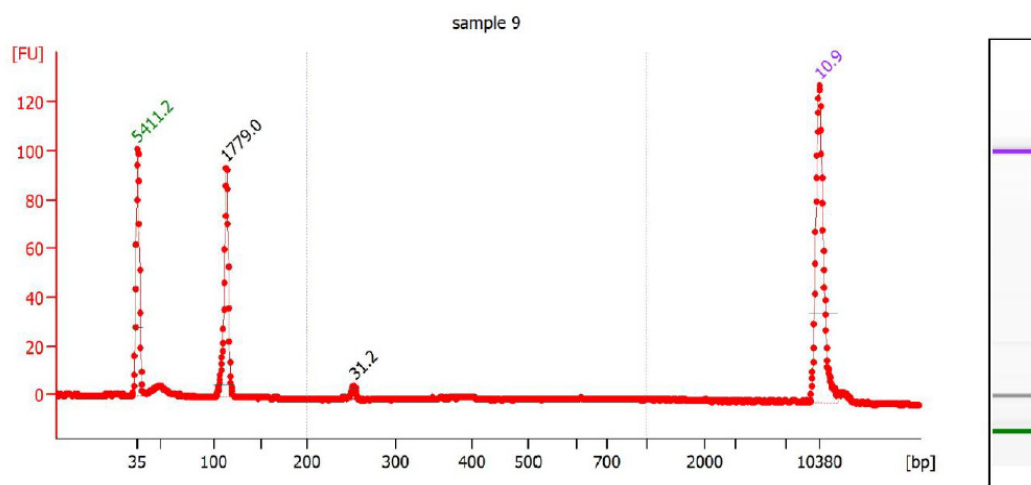
Supl. 24 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wyniki dotyczą analizy długości produktu reakcji qPCR dla mRNA kodującego białko RBM39. Uzyskano produkt długości 200 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 192 nt.

mRNA RBM39

CAAAGGGCAAGGTCTGAGGAAGAAACAAGAGACAGGAGTGATAGAGGGGGGCAGCGGGTAAGGGCTTCTCGTGAC
AGGGGAGAGCATGATAGGTCCAGAAGAGGAACTTCACACCATCGGTCTTCTCCGGAGTACAGGTCCAGGGATTGG
ATAGGGTTGAAAAGGACAGGTACAGAAGCAGTAGAGAGCGTCATGAAAGAGGCTCTCGTGACGGAGAAAGGGATCA
TGACAGGGAGCGGTCGGAAAGAAATGGGAGAGATAAAGATCGGGAAAGACTGGAAAAGGACCGGGAACGAGACAAA
ATTAGGGATCGTGACCGTGAAAGCGAAAAGGAGAGGGAGAGGGAGATTGAG

Supl. 25 Fragment sekwencji kodującej białko RBM39 Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję retencyjnego intronu, natomiast kolorem czerwonym oznaczono fragmenty sekwencji komplementarne do zaprojektowanych primerów. Primery te posłużyły do przeprowadzenia reakcji qPCR, która miała na celu identyfikację formy dojrzałej analizowanego transkryptu.

Mature product: 249 bp



Overall Results for sample 9 : sample 9

Number of peaks found: 2 Corr. Area 1: 19.5
Noise: 0.3

Peak table for sample 9 : sample 9

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	113	132.96	1,779.0	
3	253	5.21	31.2	
4	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 9 : sample 9

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	19.5	13	547	38.4	18.82	67.8	Blue

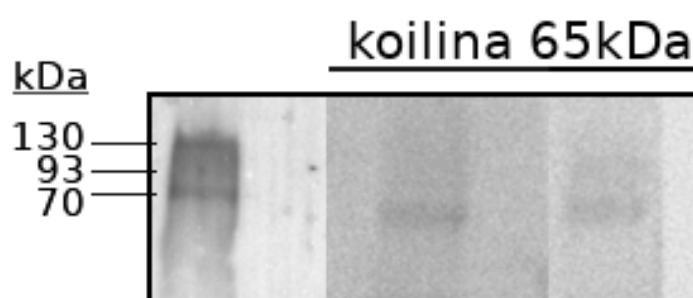
Supl. 26 Wyniki przeprowadzonej elektroforezy kapilarnej na urządzeniu Bioanalyser. Wynik dotyczy analizy długości produktu reakcji qPCR dla mRNA kodującego białko RBM39. Uzyskano produkt długości 113 nt, przy czym spodziewana długość produktu wynosiła 249 nt.

>TRINITY_DN2674_c0_g1_i1 len=6845

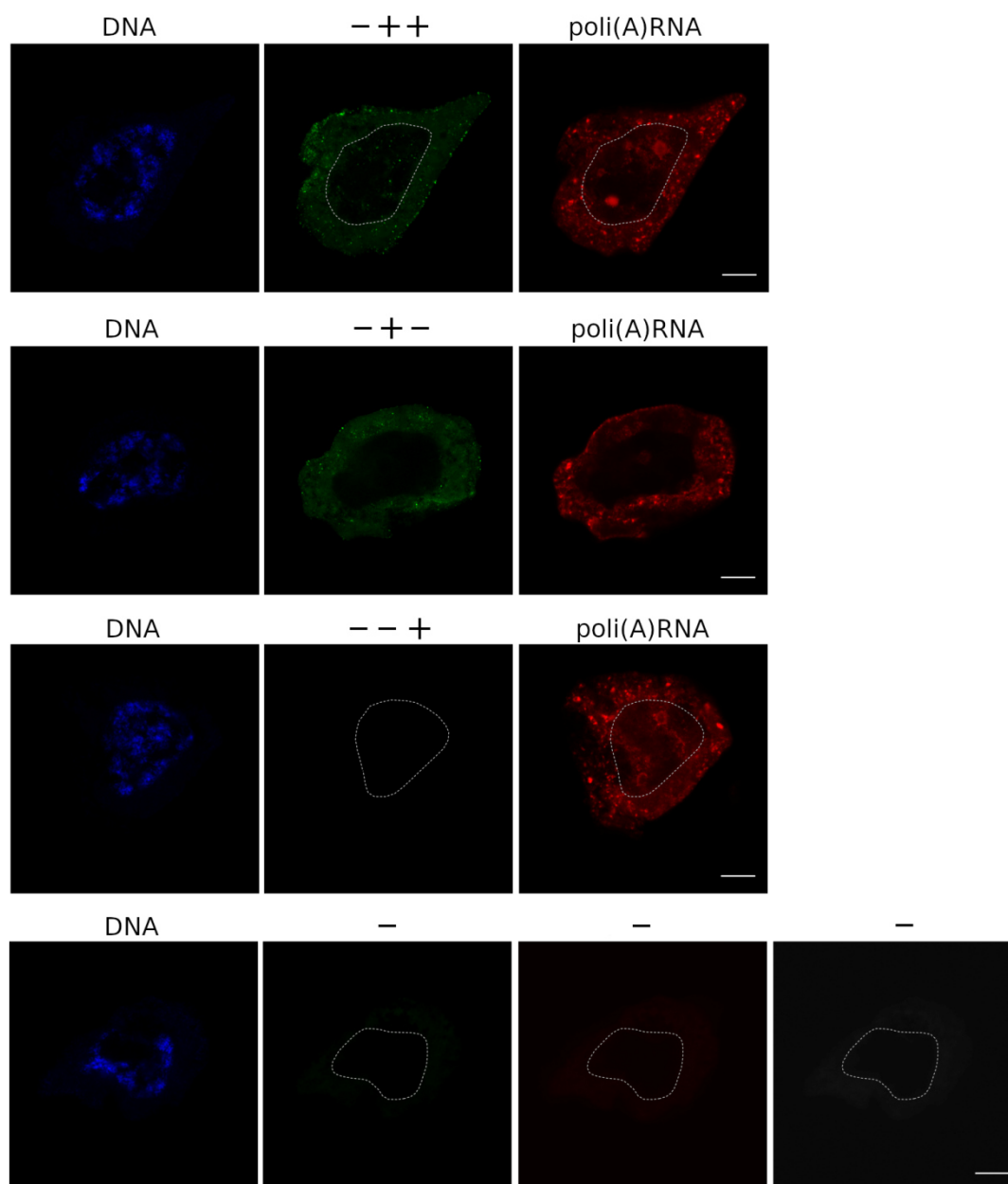
378QPALHWNGITNKRQGQNWGKERNDQVSTCSFITVDFDVSIMLLLGQEGDIIAYRLVELSTSWCEPSSFRVGTVA
WYDCQTTKIRLAPVSEYPFEFLNSLGEEDANQTGISPYNDGSLDIDFASLVDVRWVHQHKPTSEPIHIEGENKISSTD
TGTRVPVAEEPRIETHANGQRNLKSSADKNTDFPDIEKLATGTHANAEINSKSDIANFPVHTEGNGEIVSIWQEINQVF
SAKKAELALKNDQSKVEDFEAMTKTLKRPRSKGLKDINQISKQGAGEMPKHTSGSTYPRSFKALRNCALGPTISLLRA
QNTL 695

Supl. 27 Przewidywana sekwencja fragmentu domeny Tudor białka koiliny u modrzewia europejskiego. Wynik uzyskany w wyniku zmapowania modrzewiowej sekwencji nukleotydowej o długości 6845 nt do sekwencji koiliny blisko spokrewnionego gatunku

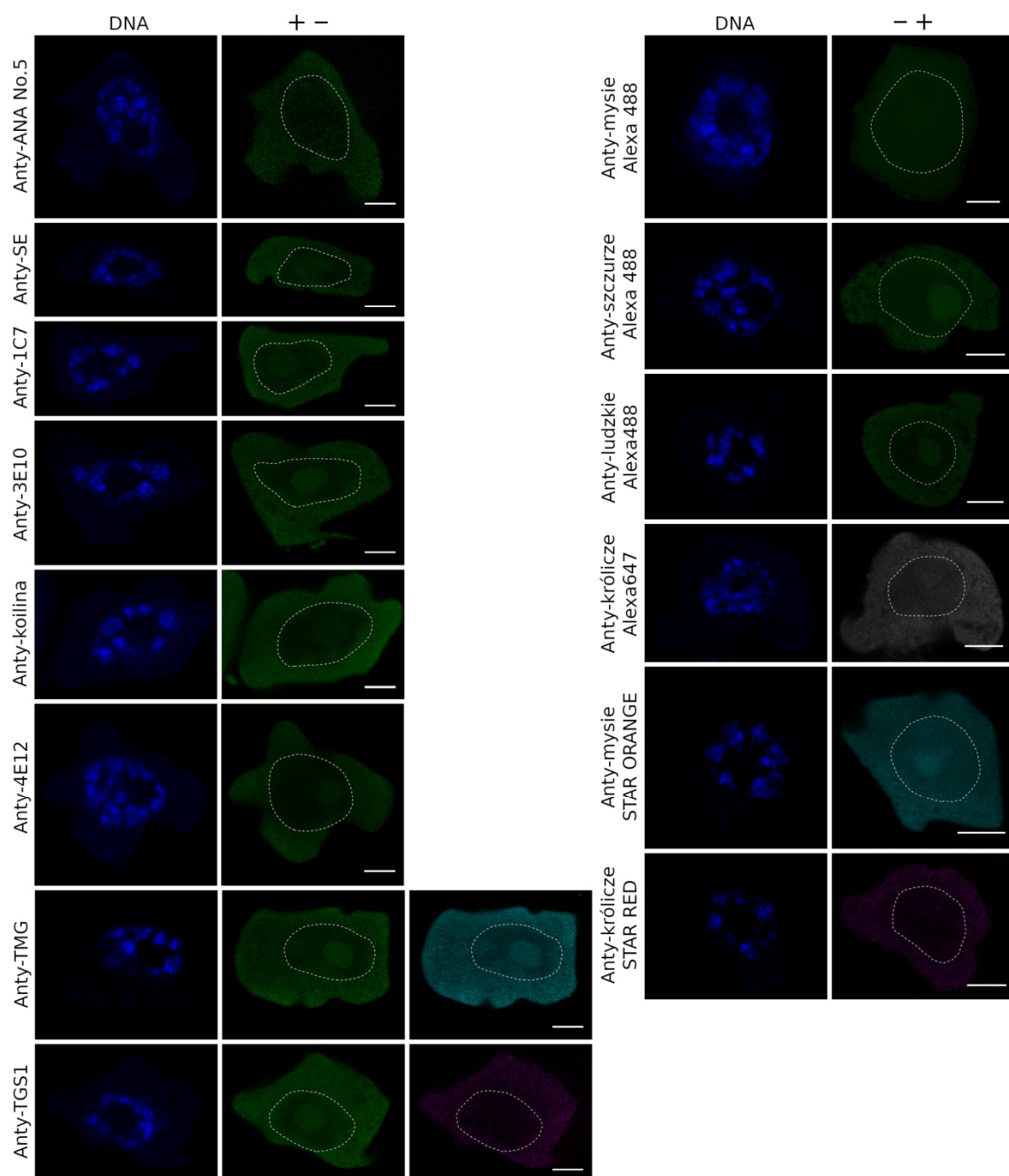
Cryptomeria japonica (szydlica japońska). Wynik obejmuje fragment o największej homologii mapowanej sekwencji nukleotydowej modrzewia względem sekwencji aminokasowej *Cryptomeria japonica*. Na czerwono zaznaczono obszar domeny charakteryzujący się najmniejszą zmiennością sekwencji aminokwasowej w obrębie różnych gatunków roślin. Posłużył on do wybrania najlepszej sekwencji krótkiego peptydu, który kolejno wykorzystano do immunizacji królika celem wyprodukowania specyficznych przeciwciał anty-koilina. Produkcję przeciwciała zlecono firmie Davids Biotechnologie w Niemczech.



Supl. 28 Specyficzność antygen(koilina)/przeciwciało anty-koilina. Wyniki analizy metodą Western blot wykazującej specyficzność przeciwciała poliklonalnego stosowanego w immunozakowaniu.. Po lewej stronie: marker masy cząsteczkowej. Po prawej stronie - przeciwciało poliklonalne królicze anty-koilina (w 2 powtórzeniach) wyprodukowane na zlecenie przez firmę Davids Biotechnologie w Niemczech. Przypuszczalna masa koiliny u modrzewia europejskiego to około 65 kDa, co potwierdzają powyższe wyniki.



Supl. 29 Tablica przedstawiająca wyniki reakcji kontrolnych. Od góry: reakcja kontrolna bez użycia sondy, następnie reakcja kontrolna bez użycia sondy i wtórnego przeciwciała anty-króliczego (inkubowano jedynie z przeciwciałem pierwotnym króliczym anty-DIG), poniżej reakcja bez użycia sondy oraz przeciwciała pierwotnego anty-DIG (inkubowano jedynie z przeciwciałem wtórnym anty-króliczym). Dolny panel: reakcja kontrolna bez zastosowania: sondy, króliczego przeciwciała pierwotnego anty-DIG i koziego przeciwciała wtórnego anty-króliczego. Skala - 10 μ m.



Supl. 30 Tablica przedstawiająca wyniki reakcji kontrolnych. Panel z lewej strony: reakcje kontrolne bez użycia przeciwciała wtórnego. Inkubacja była prowadzona z zastosowaniem jedynie przeciwciał pierwotnych: anty-ANA No.5 (stosowane do detekcji białek Sm), anty-SE (stosowane do detekcji białka SERRATE), anty-1C7 (stosowane do detekcji NP białka Pol RNA II), anty-3E10 (stosowane do detekcji aktywnej polimerazy), anty-koilina (stosowane do detekcji białka koiliny), anty-4E12 (stosowane do detekcji syntezy snRNA), anty-TMG (stosowane do detekcji modyfikacji końca 5' snRNP – czapeczki

TMG), *anty-TGS1* (stosowane do detekcji enzymu TGS1). Panel z prawej strony: reakcje kontrolne bez użycia przeciwciała pierwotnego. Inkubacja była prowadzona z zastosowaniem jedynie przeciwciał wtórnych: *anty-mysiego z Alexa 488*, *anty-szczurzego Alexa 488*, *anty-ludzkiego Alexa 488*, *anty-królicze Alexa 647*, *anty-mysie STAR orange*, *anty-królicze STAR red*. Skala - 10 μm .