

Regulacja posttranskrypcyjna mRNA pośredniczona przez białka dekapujące i degradujące w cytoplazmie i ciałach przetwarzających *Larix Decidua*

Streszczenie

Znaczenie. Potranskrypcyjna kontrola stabilności i degradacji mRNA jest centralnym regulatorem ekspresji genów w trakcie rozwoju, decydując o tym, które transkrypty są dostępne do translacji i kiedy. W kontekście rozwoju wciąż słabo wiemy, gdzie w komórce i kiedy działają szlaki degradacji mRNA. Dotyczy to szczególnie dekapingu inicjującego degradację 5'→3'. Mikrosporocyty *Larix decidua* stanowią naturalny model: podczas długiego okresu diplotenu (trwającego kilka miesięcy) wykazano powtarzalne, cykliczne fale transkrypcji oraz wyraźny, pięcioetapowy cykl poli(A) RNA, tworzy to doskonały model pozwalający powiązać losy mRNA z zaprogramowanymi zdarzeniami rozwojowymi.

Luka badawcza. Liczne prace opisywały ciała P oraz aparat dekapingu głównie w modelach komórki zwierzęcej oraz poza ściśle zdefiniowanymi programami rozwojowymi. Znacznie mniej wiadomo o tym, czy ciała P formują się i aktywnie pośredniczą w dekapingu zależnym od degradacji 5'→3' w trakcie rozwoju roślin. W mikrosporocytach *Larix decidua* cykl poli(A) RNA kończy się wyraźnym, spadkiem (etap 5) poziomu mRNA w cytoplazmie. Nie zweryfikowano dotąd, w jakim stopniu dekaping zachodzący w ciałkach P (DCP2, DCP5, EDC4/VCS, LSM4) oraz następująca po nim degradacja egzonukleolityczna 5'→3' z udziałem XRN4 przyczyniają się do tego procesu. W konsekwencji brakuje jednoznacznych danych łączących zmiany liczby i objętości ciałek P oraz etapową rekrutację tych białek z efektami transkryptomowymi — w szczególności ze spadkiem poziomu cytoplazmatycznego poli(A) RNA w etapie 5 i innymi wskaźnikami losów transkryptów podczas mejozy.

Cele. W rozprawie zrealizowałem trzy skoordynowane cele.

- (1) Sprawdzić, czy ciała P formują się i pełnią funkcję miejsc dekapingu/degradacji w pięcioetapowym cyklu poli(A) RNA oraz czy dekaping przyczynia się do późnego spadku poziomu poli(A).
- (2) Ilościowo opisać, jak między etapami zmieniają się parametry ciałek P (liczba na komórkę, średnia objętość, rozkład klas objętościowych) oraz ich skład białkowy (DCP5, DCP2, EDC4, LSM4, XRN4).

(3) Zidentyfikować zestawy transkryptów powiązanych z poszczególnymi komponentami dekapingu metodą RIP-seq (RNA-immunoprecypitacja z sekwencjonowaniem), aby wytypować kandydatów do dalszej weryfikacji funkcjonalnej.

Cele sformułowano tak, by przejść od opisu morfologicznego do wnioskowania mechanistycznego oraz identyfikacji celów eksperymentalnych.

Metodyka. Aby precyzyjnie powiązać lokalizację sygnałów z ich zmianami w czasie rozwoju, zastosowano mikroskopię konfokalną i analizę w pięciu kolejnych etapach (1–5). Oznaczano: (i) poziom cytoplazmatycznego RNA poli(A), (ii) liczbę ciałek P, ich objętość i rozkład klas objętości, oraz (iii) rozmieszczenie i kolokalizację białek DCP5, DCP2, EDC4/VCS, LSM4 i XRN4. Interakcje białko–białko weryfikowano za pomocą biochemicznego wzbogacania frakcji ciałek P oraz koimmunoprecypitacji. Z kolei metoda RIP-seq (immunoprecypitacja RNA z sekwencjonowaniem) posłużyła do identyfikacji transkryptów związanych z DCP2, DCP5, EDC4 i LSM4.

Najważniejsze wyniki. Ciała P powstają w diplotenie i ulegają dynamicznym zmianom w całym cyklu poli(A) RNA. Ciała średnie ($0,3\text{--}1,2\ \mu\text{m}^3$) stanowią klasę dominującą, natomiast większe ($1,2\text{--}6\ \mu\text{m}^3$) pojawiają się liczniej wraz z rekrutacją składników katalitycznych. Kolejność rekrutacji białek jest stała: DCP5 i LSM4 (białka organizujące i przygotowujące kompleks do dekapingu) osiągają wczesne maksimum (etap 3), następnie na etapie 4 uaktywnia się moduł katalityczny dekapingu (DCP2, EDC4/VCS), a kolokalizacja XRN4 wyraźnie rośnie w etapach 4-5. Wskazuje to na etap 4 jako punkt kontrolny i szczyt aktywności, a na etap 5 jako fazę wygaszania i końcowego porządkowania. Koimmunoprecypitacja potwierdza istnienie rdzeniowego modułu DCP5–DCP2–EDC4, natomiast LSM4 i XRN4 wykazują bardziej dynamiczne, późniejsze włączanie się w szlak. Analiza RIP-seq zidentyfikowała 413 sekwencji (w tym 216 adnotowanych transkryptów mRNA), obejmujących zarówno zbiór wspólny, jak i zestawy specyficzne dla poszczególnych białek. Analiza funkcjonalna tych transkryptów wskazała nadreprezentację procesów i komponentów związanych z mitochondriami, chloroplastami i błonami, co wskazuje konkretne transkrypty będące kandydatami do dalszej weryfikacji funkcjonalnej.

Wnioski. Wyniki łącznie opisują etapowy, zależny od dostępności substratu program kontroli stabilności i degradacji cytoplazmatycznego mRNA w mikrosporocytach *Larix decidua*. W tym układzie ciała P są głównymi miejscami reakcji, koordynując dekaping i następującą po nim degradację 5'→3' w trakcie mejozy. Praca wypełnia istotną lukę, pokazując aktywność

ciałek P w ramach jasno zdefiniowanego programu rozwojowego, oraz przedstawia zestaw metod: ilościowe obrazowanie, analizy molekularne oraz zweryfikowany zbiór danych RIP-seq. Zbieżność czasowo-przestrzenna wskazuje, że dekaping przyczynia się do późnego spadku poziomu poli(A) RNA w diplotenie mikrosporocytów *L. decidua*, choć najpewniej biorą w nim udział również inne ścieżki (deadenylacja/egzosom, obniżenie transkrypcji). Dlatego praca przedstawia konkretny plan doświadczeń i precyzuje cele molekularne, które umożliwią jednoznaczne rozróżnienie tych ścieżek.