

Po transkrypcji, a właściwie już w jej trakcie, syntetyzowane cząsteczki RNA podlegają dodatkowej obróbce, czyli ulegają dojrzewaniu. Tylko dojrzałe cząsteczki RNA są w pełni funkcjonalne i mogą wypełniać przypisane im funkcje. Jedną z trzech głównych enzymów odpowiedzialnych za przepisywanie informacji genetycznej z DNA na RNA jest polimeraza RNA II (Pol II), która jest zaangażowana w transkrypcję genów kodujących białka, ale także innych ważnych cząsteczek RNA. Wszystkie transkrypty syntetyzowane przez Pol II mają dołączoną do ich 5' końca specjalną strukturę zwaną czapczką, a ich koniec 3' jest zmieniony poprzez dodanie kilkuset nukleotydów adeninowych (ogon poliA), o których dodanie nie jest zakodowane w przepisywanych przez Pol II genach - proces ten nazywamy poliadenylacją. Większość transkryptów Pol II posiada także introny, czyli sekwencje niekodujące, które muszą zostać usunięte w procesie składania RNA. Proces ten nazywamy splicingiem. Miejsca dodawania ogona poli(A) oraz identyfikacja sekwencji intronowych to bardzo ważny etap wyrażania się genów, czyli ich ekspresji. Każdy transkrypt może ulec dojrzewaniu na kilka różnych sposobów. Dotyczy to selekcji wycinanych sekwencji niekodujących - intronów, a także miejsc w których zachodzi poliadenylacja. W wyniku tych procesów z jednego genu może powstać kilka różnych dojrzałych transkryptów, a w konsekwencji kilka różnych białek.

Projekt dotyczy regulacji wyboru miejsc, w których zachodzi poliadenylacja. W naszych badaniach wykorzystamy roślinę modelową, *Arabidopsis thaliana*. Zaplanowane doświadczenia wykonywane będą w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz w Uniwersytecie w Bielefeld w Niemczech. Obie współpracujące ze sobą grupy badawcze, Artura Jarmołoskiego w Poznaniu i Dorothee Staiger w Niemczech, od wielu lat badają RNA u roślin. Oba zespoły rozwinęły i stosują nowoczesne metody badawcze, których zastosowanie jest kluczowe dla realizacji zaplanowanych badań.

Nasze wcześniejsze badania pokazały, że sekwencja rozpoznawana przez U1 snRNP, cząstkę rybonukleoproteinową zaangażowaną w wycinanie intronów, hamuje proces poliadenylacji. **Naszym głównym celem jest poznanie sposobu tej komunikacji między U1 snRNP a maszyną poliadenylującą.** Z wykonanych przez nas eksperymentów wynika, że dwa białka U1 snRNP, 70K i PRP40, najprawdopodobniej kontaktują się z uczestniczącym w poliadenylacji kompleksem CFI. Sugeruje to, że właśnie kompleks CFI może być zaangażowany w hamowanie poliadenylacji przez U1 snRNP. Chcemy zweryfikować hipotezę, że to właśnie oddziaływanie pomiędzy białkami U1 snRNP i kompleksem CFI odpowiada za hamowanie poliadenylacji przez U1 snRNP. W projekcie zbadamy do jakich sekwencji wiążą się wszystkie podjednostki roślinnego kompleksu CFI. Co więcej, zidentyfikujemy występujące obok miejsca wiązania U1 snRNP. Zastosujemy do tego celu niezwykle skuteczną technikę iCLIP. Wykorzystując mutanty *Arabidopsis*, w których brakować będzie pojedynczych lub dwóch podjednostek kompleksu CFI, zbadamy, jaki wpływ ma ich brak na wybór miejsc poliadenylacji. W tym celu scharakteryzujemy końce 3' wszystkich cząsteczek RNA pochodzących z roślin typu dzikiego (wt) i mutanty, w których brakowało będzie jednej lub kilku podjednostek kompleksu CFI. Do badań zastosujemy metodę sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Na podstawie tych analiz zidentyfikujemy geny, w których wybór miejsca poliadenylacji zależy od CFI, a jednocześnie w jego sąsiedztwie jest miejsce rozpoznawane przez U1 snRNP. Dla kilku wybranych przypadków wykonamy analizy funkcjonalne, mutując miejsca wiązania U1 oraz miejsca rozpoznawane przez CFI w przygotowanych minigenach. Analizy te przeprowadzimy w protoplastach roślin typu wt oraz poszczególnych mutantach CFI. Zamierzamy także zbadać, jaki wpływ mają podjednostki kompleksu CFI na proces wycinania intronów, czyli splicing. Wykorzystując nowoczesną metodę PLA pokażemy bezpośrednio w komórce oddziaływanie U1 snRNP i kompleksu CFI.

**Nasze badania po raz pierwszy pokażą wpływ U1 snRNA na splicing u roślin, a także zidentyfikują miejsca poliadenylacji, których wykorzystanie zależy od kompleksu CFI.**