

Streszczenie

Temat:

Chloroplast retrograde control of miRNA expression in response to high light stress

Rola retroaktywnych sygnałów chloroplastowych w zależnej od miRNA odpowiedzi roślin na stres świetlny

In response to developmental and environmental cues such as high light (HL), chloroplasts produce signals which affect the expression of nuclear genes. This signaling process is called retrograde signaling. Among environmentally responsive nuclear genes the important role could be assigned to MIR genes encoding micro RNAs (miRNAs). These regulatory molecules are involved in post-transcriptional tuning of stress response and acclimation.

This dissertation aimed to identify HL-responsive miRNAs and verify the role of retrograde signaling in their expression. Micro-transcriptomic sequencing of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to HL followed by qPCR analysis was applied to find miRNAs regulated by HL. The number of HL-responsive miRNAs was limited either in shoots directly subjected to HL or systemic roots. Moreover, roots separated from rosettes failed to maintain HL-induced miRNA expression changes. Inconsistency in the level of primary transcripts (pri-miRNAs) and the level of their cognate miRNAs indicates a vital role of miRNA stability and its efficient maturation. Therefore, the role of HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) in the processing of HL-induced miR163 and miR840 was verified. Different expression patterns of pri- and miR163 compared to pri- and miR840 in the *hyl1* plants indicated a crucial role of HYL1 protein in miR163, but not miR840 maturation. A diverse effect of HL on the stability of pri-miR163 and pri-miR840 was also observed. The impact of retrograde signals on miRNA expression was verified using a chemical and genetic approaches. Similar changes in pri-miR163 and pri-miR840 levels, whether plastoquinone (PQ) is oxidized or reduced suggest that a stress signal is generated upstream to PQ, in photosystem II (PSII). In PSII, the HL causes the singlet oxygen (1O_2) accumulation and subsequent oxidation of β -carotene resulting in the formation of volatile compounds such as β -cyclocitral (β -CC). The role of the MBS1 protein, in the HL signal transfer to the nucleus was verified. The induction of pri-miR163 and pri-miR840 levels after β -CC treatment with the disturbed pattern of their expression in *mbs1* mutant versus wild-type plants indicated a crucial role of this 1O_2 signaling pathway in miRNA-mediated response to HL.

To sum up, this dissertation provided evidence that HL influences miRNA expression. In these stress conditions, the signals derived from chloroplast, including 1O_2 signaling, have been proven to be vital determinants of miRNA level. Moreover, the presented work creates new scenarios for studying retrograde control of miRNA metabolism in changing environment.

W odpowiedzi na czynniki rozwojowe i środowiskowe takie jak stres wysokiego światła (ang. high light – HL) chloroplasty generują sygnały, które wpływają na ekspresję genów w jądrze komórkowym. Taki przekaz sygnału nazywamy komunikacją retroaktywną. Pośród genów jądrowych reagujących na zmieniające się warunki środowiska ważną rolę odgrywają geny MIR kodujące mikro RNA (miRNA), które są cząsteczkami regulatorowymi działającymi na poziomie postranskrypcyjnym i dostarczają odpowiedź molekularną rośliny na stresy umożliwiając ich aklimatyzację. Ta rozprawa doktorska miała na celu identyfikację miRNA biorących udział w odpowiedzi na stres świetlny oraz określenie roli wybranych sygnałów retroaktywnych w regulacji ekspresji tych miRNA. Identyfikacji miRNA dokonano poprzez sekwencjonowanie puli miRNA z roślin *Arabidopsis thaliana* eksponowanych na HL i walidację wyników z udziałem metod opartych na PCR w czasie rzeczywistym. Zakres zmian ekspresji miRNA pod wpływem HL był niewielki zarówno w rozetach narażonych bezpośrednio na HL jak i korzeniach systemowych pozostających w ciemności. Korzenie oddzielone od rozet i naświetlane HL, nie wykazywały zmian w ekspresji miRNA widocznych w korzeniach systemowo narażonych na HL. Niespójność w poziomach ekspresji pierwotnych transkryptów (ang. primary transcripts - pri-miRNAs) i odpowiadających im miRNA indukowanych przez HL wskazuje na kluczową rolę stabilności i efektywnego dojrzewania miRNA w tym stresie. Rolę białka HYL1 w dojrzewaniu regulowanych przez HL miRNA, zbadano na przykładzie miR163 i miR840. Akumulacja pri-miR163 i spadek miR163 w mutancie *hyl1* przy wzroście poziomu miR840 wskazują na ważną rolę HYL1 w biogenezie miR163, ale nie miR840. Dodatkowo udowodniono, że HL regulował odmiennie stabilność pri-miR163 i pri-miR840. Wpływ sygnałów retroaktywnych na ekspresję omawianych miRNA zbadano poprzez zastosowanie inhibitorów łańcucha fotosyntetycznego lub analizę mutantów rzodkiewnika. Podobny charakter zmian na poziomie pri-miRNA, niezależnie od tego, czy pula redoks plastochinonu (ang. plastoquinone –PQ) była utleniona, czy zredukowana, sugerują, że sygnał stresowy jest generowany wyżej w łańcuchu fotosyntetycznym – w fotosystemie II (ang. Photosystem II-PSII). W HL w PSII gromadzi się tlen singletowy ($1O_2$), co prowadzi do utlenienia β -karotenu i powstania jego lotnych pochodnych, takich jak β -cyklocytral (β -CC). Następnie, za pośrednictwem białka MBS1, sygnał stresowy jest transportowany do jądra. Wzrost ekspresji pri-miR163 i pri-miR840 po traktowaniu β -CC w połączeniu z zaburzoną odpowiedzią mutantu *mbs1* na HL względem roślin dzikiego typu wskazuje na kluczową rolę tego szlaku sygnałowego $1O_2$ w regulacji miRNA w stresie HL.

Podsumowując, niniejsza rozprawa dostarczyła dowodów na udział HL w regulacji ekspresji miRNA. Wykazano też, że w tych stresowych warunkach, sygnały retroaktywne w tym ścieżki sygnałnej zależne od $1O_2$ determinują poziom ekspresji miRNA. Co więcej, zaprezentowana praca tworzy wiele nowych scenariuszy badania roli sygnałów retroaktywnych i metabolizmu miRNA w zmiennym środowisku.

Anna Barczak - Paszyk